

Proyecto Fin de Carrera

pH interno en geles de polivinilimidazol



**Escuela Politécnica Superior
Universidad Carlos III de Madrid**

**Departamento de Ciencia e Ingeniería
de Materiales e Ingeniería Química**

Autor: Manuel Rupérez Arroyo

Tutora: Prof. Dra. Bernarda Serrano Prieto

RESUMEN

En el presente trabajo se ha establecido un método para medir el pH en el interior de hidrogeles hinchados de poli(N-vinilimidazol) a través de las variaciones en el tiempo de vida de una sonda fluorescente sensible al pH. Se han contrastado el modelo teórico de hinchamiento y los estudios precedentes sobre este tipo de hidrogeles con nuestras observaciones, encontrando en este método de caracterización fotofísica una herramienta útil y prometedora, a pesar de que la sonda fluorescente escogida para el estudio tiene un comportamiento fotofísico complejo que no permite una medida unívoca del pH interno. Para conseguir este tipo de medidas, se ha instalado un dispositivo instrumental consistente en un fluorímetro de resolución temporal que realiza la excitación de las sondas fluorescente con dos lámparas LED pulsadas. Junto con este fluorímetro, el método descrito para obtener el pH interno de los hidrogeles integra un protocolo basado en medidas de absorción que completa la caracterización fotofísica de la sonda y da una descripción detallada de sus cambios en el interior del hidrogel.

ABSTRACT

A new method that measures the pH inside swollen poly(N-vinylimidazole) hydrogels through changes in the fluorescence lifetimes of a pH-sensitive probe has been established. The theoretical model behind as well as other preceding research work have been put in contrast to our experimental observations, finding in this photophysical method a very useful and promising tool, in spite of the probe chosen for this research work, that exhibits a complex behavior which hinders the univocal measurement of the pH inside the swollen gel. In order to accomplish these measurements a device consisting of a fluorometer for time-resolved measurements was installed, using two pulsed LED-lamps in order to enable the excitation of the fluorescent probes. Together with this fluorometer, the above-described method to measure the pH inside the hydrogels combines a protocol based on absorption measurements that completes the photophysical characterization of the fluorescent probe as well as it provides a detailed descriptions of its changes inside the hydrogel.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera mostrar mi agradecimiento, en primer lugar, a la Prof. Berna Serrano y al Prof. Juan Baselga, por confiar en mí para llevar a cabo este trabajo y por permitirme culminar una etapa a la que uno la urgencia del momento con la síntesis de todo un cúmulo de experiencias, vitales y académicas. A pesar de algunos momentos de duda y de abandono, me han mostrado su apoyo a lo largo de los años y me han permitido introducirme en un mundo apasionante y complejo, donde siempre me he sentido como en casa.

También tengo una deuda de gratitud con mi hermano Jorge, quien me ha acompañado en la mayor parte de esta carrera y con quien he compartido clases, laboratorios, horas de estudio y, sobre todo, vida. A ti que me has animado a seguir siempre adelante y que tanto te has esforzado por que llegara este momento, gracias. Y gracias en fin a todos los que han soportado con asombro y paciencia –a partes iguales– mis relatos inquietantes sobre la fluorescencia, los geles y la poesía que se esconde detrás de cada ecuación.

ACKNOWLEDGEMENTS

First of all, I would like to show my gratitude to Prof. Berna Serrano and Prod. Juan Baselga for their confidence given to me to accomplish this work and for allowing me to conclude this stage where I put together the rush of the moment and the summary of both academic and vital experiences. In spite of some moments of doubt and defeat they have showed me a lasting support and they have let me introduced myself into a complex and enthralling world where I always felt like home.

I also owe to my brother Jorge my gratitude for being a great company during the greatest part of these studies. With him I shared classes, lab work, hours of study but, above all, life. To you, who has always encouraged me to go on; to you, who has done such a great effort to make this moment come up, thanks! And thanks as well to all of you who have put up (astonished and patient, in equal parts) with my thrilling stories about fluorescence, gels and all the Poetry behind each equation.

*Hay muchas formas de luminiscencia
en compuestos, cerámicas, metales;
narraré una de las principales,
la que denominamos fluorescencia;*

*estad atentos y sabréis su esencia:
los e^- en sus orbitales
tienden a estados fundamentales
mucho más probables, mas en presencia*

*de la luz justa que cambia su estado
se excitan y absorben tal energía,
mas para volver al nivel pasado,*

*a la incertidumbre que los regía,
emiten luz, siempre a menor frecuencia.
Ya lo dije: esto es fluorescencia.*

ÍNDICE GENERAL

	<i><u>Página</u></i>
Resumen (Abstract)	<i>iii</i>
Agradecimientos (Acknowledgements)	<i>iv</i>
Lista de abreviaturas, símbolos y constantes	<i>x</i>
Capítulo 1. Objetivos	<i>2</i>
Capítulo 2. Fundamento teórico	<i>4</i>
2.1. Equilibrio químico	<i>4</i>
2.1.1. Equilibrio electroquímico. Modelo de Debye-Hückel	<i>5</i>
2.1.2. Constantes de disociación y pH	<i>7</i>
2.1.3. Disoluciones tampón	<i>8</i>
2.1.4. Ecuación de Henderson-Hasselbach	<i>9</i>
2.1.5. Valoración ácido-base	<i>10</i>
2.2. Hinchamiento de geles	<i>10</i>
2.2.1. Introducción	<i>11</i>
2.2.2. Modelo de hinchamiento de geles de polielectrolito	<i>12</i>
2.2.3. Cálculo del pH en el interior de un gel	<i>14</i>
2.2.4. Grado de ionización y constante de disociación	<i>17</i>
2.3. Espectroscopía de fluorescencia	<i>19</i>
2.3.1. Luminiscencia	<i>19</i>
2.3.2. Apuntes históricos sobre la fluorescencia	<i>20</i>
2.3.3. Transiciones electrónicas moleculares	<i>21</i>
2.3.4. Hipótesis y aproximaciones convencionales en espectroscopía	<i>22</i>
2.3.5. Procesos característicos del estado excitado	<i>23</i>
2.3.6. Propiedades relacionadas con la fluorescencia	<i>26</i>
2.3.7. Factores que afectan a la fluorescencia	<i>28</i>
2.4. Sondas fluorescentes sensibles al pH	<i>29</i>
2.4.1. Criterios de selección de sondas fluorescentes	<i>29</i>
2.4.2. Mecanismos de reacción en sondas fluorescentes sensibles al pH	<i>30</i>

	<i><u>Página</u></i>
Capítulo 3. Método experimental	34
3.1. Instrumentación	34
3.1.1. Espectroscopía UV-visible	34
3.1.2. Espectroscopía de fluorescencia	35
3.1.2.1. Elementos característicos de un fluorímetro	36
3.1.2.2. Detección de fotones con correlación temporal (TCSPC)	38
3.1.2.3. Resolución temporal	39
3.1.2.4. Fuentes de error en espectroscopía de resolución temporal	40
3.1.2.5. Medidas de tiempos de vida de fluorescencia	43
3.1.3. Medida de pH	45
3.1.4. Diseño de elementos para la configuración del fluorímetro	47
3.1.5. Otros dispositivos experimentales	49
3.2. Metodología experimental	49
3.2.1. Caracterización optoelectrónica de las fuentes de excitación	50
3.2.1.1. Monitorización de la señal de disparo de los pulsos de excitación	50
3.2.1.2. Optimización por software de los parámetros de la señal	51
3.2.1.3. Variación de la intensidad con la frecuencia de pulsación	52
3.2.1.4. Medida del ancho espectral y ancho de pulso	52
3.2.2. Caracterización fotofísica de sondas fluorescentes	53
3.2.2.1. Medida de los espectros de absorción	53
3.2.2.2. Medida de los espectros de emisión de fluorescencia	54
3.2.2.3. Medida del rendimiento cuántico	55
3.2.2.4. Medida de tiempos de vida por métodos de deconvolución	56
3.2.3. Curvas de calibrado en función del pH	56
3.2.3.1. Método ratiométrico	56
3.2.3.2. Calibración basada en tiempos de vida de fluorescencia	58
3.2.4. Valoraciones espectrofotométricas	59
3.2.5. Cálculo de la concentración óptima de cromóforo	62
3.2.6. Hinchamiento de geles	66
3.2.6.1. Preparación de las muestras	67
3.2.6.2. Determinación del punto de equilibrio	68
3.2.6.3. Medida del grado de hinchamiento del hidrogel	69
3.2.6.4. Medida de tiempos de vida de fluorescencia en geles hinchados	71
3.2.6.5. Medida del cambio en la concentración de la sonda en disolución	71

	<i><u>Página</u></i>
3.3. Materiales	71
3.3.1. Hidrogeles de poli(N-vinilimidazol)	72
3.3.2. Sondas fluorescentes	73
3.3.3. Disolventes y otros reactivos	77
3.3.4. Otros materiales	78
Capítulo 4. Resultados	80
4.1. Caracterización optoelectrónica de las fuentes de excitación	80
4.1.1. Monitorización de la señal de disparo de los pulsos de excitación	80
4.1.2. Optimización por software de los parámetros de la señal	82
4.1.3. Variación de la intensidad con la frecuencia de pulsación	83
4.1.4. Medida del ancho espectral y ancho de pulso	84
4.2. Caracterización fotofísica de la fluoresceína	87
4.2.1. Medidas de tiempo de vida con un estándar de referencia	87
4.2.2. Criterios de selección de sondas fluorescentes sensibles al pH	89
4.2.3. Caracterización del C-SNARF-1 como sonda sensible al pH	92
4.3. Medidas con resolución temporal para sondas sensibles al pH	98
4.4. Hinchamiento de geles	100
4.4.1. Medidas preliminares	100
4.4.2. Grado de hinchamiento	104
4.4.3. Medidas de tiempo de vida de fluorescencia en hidrogeles	105
4.4.4. Cambios en la concentración de sonda en el sobrenadante	106
Capítulo 5. Análisis de los resultados	110
5.1. Características de funcionamiento del fluorímetro de resolución temporal	110
5.2. Medidas de tiempo de vida de fluorescencia de sondas de referencia	113
5.3. Determinación de la constante de disociación ácida de la sonda fluorescente	114
5.4. Caracterización del C-SNARF-1 como sonda fluorescente sensible al pH	117
5.4.1. Parámetros fotofísicos de la sonda C-SNARF-1	117
5.4.2. Uso del C-SNARF-1 como sensor de pH por métodos ratiométricos	119
5.4.3. Uso del C-SNARF-1 como sensor de pH por medidas de resolución temporal	121
5.5. Determinación fotofísica del pH en el interior de un hidrogel	121
5.5.1. Grado de hinchamiento de hidrogeles	121
5.5.2. Valores calculados de pH en el interior de los hidrogeles	124
5.5.3. Características de los hidrogeles obtenidas por espectroscopía de fluorescencia	127

	<u>Página</u>
Capítulo 6. Conclusiones	135
Bibliografía	138
Apéndices	
A.1. Montaje del fluorímetro de resolución temporal	146
A.2. Manual de uso rápido del fluorímetro de resolución temporal	149
A.2.1. Elección de la fuente de excitación	149
A.2.2. Pasos para obtener los decaimientos	152
A.2.3. Pasos para obtener los tiempos de vida fluorescencia	153
A.3. Protocolo de valoración espectrofotométrica	154
A.4. Preparación de disoluciones tampón	158
A.4.1. Disoluciones tampón de ion fosfato	158
A.4.2. Disoluciones tampón de imidazol	161
A.4.3. Tampones comerciales	162
A.5. Estimación de parámetros y cálculo de errores	164
A.5.1. Intervalos de confianza para la estimación de la media muestral	164
A.5.2. Propagación de errores en las medidas indirectas	166
A.5.3. Estimación e intervalos de confianza de parámetros de regresión lineal	168
A.5.4. Tabla de la distribución <i>t</i> -Student	171
A.6. Análisis de datos en medidas TCSPC	172
A.6.1. Método de deconvolución de tiempos de vida por mínimos cuadrados no lineales	173
A.6.2. Modelos exponenciales de decaimiento	174
A.6.3. Algoritmo numérico para resolver el problema de mínimos cuadrados no lineales	175
A.6.4. Simplificaciones en el método computacional	177
A.6.5. Idoneidad del modelo. Test de bondad del ajuste	178
A.7. Métodos numéricos para el acondicionamiento de señales	181
A.7.1. Corrección de la línea de base por mínimos cuadrados	181
A.7.2. Acondicionamiento de señales mediante filtros de Savitzky-Golay	182

Valores y unidades de las constantes físicas^[1]

<i>Símbolo</i>	<i>Significado</i>	<i>Valor y unidades</i>
c	Velocidad de la luz en el vacío	299.792.458 m/s
ε_0	Constante dieléctrica en el vacío	$8,854187817 \cdot 10^{-12}$ F/m
h	Constante de Planck	$6,6260693 \cdot 10^{-34}$ J·s
q_0	Carga elemental	$1,602\ 176\ 53 \cdot 10^{-19}$ C
R_0	Constante de Rydberg	$1,0973731568525 \cdot 10^7$ m ⁻¹
m_e	masa del electrón	$9,109\ 3826 \cdot 10^{-31}$ kg
m_p	masa del proton	$1,67262171 \cdot 10^{-27}$ kg
m_n	masa del neutron	$1,67492728 \cdot 10^{-27}$ kg
N_A	Número de Avogadro	$6,0221415 \cdot 10^{23}$ mol ⁻¹
F	Constante de Faraday	96485,3383 C/mol
k	Constante de Boltzmann	$1,3806505 \cdot 10^{-23}$ J/K
R	Constante universal de los gases	$0,08205746$ atm·l· mol ⁻¹ ·K ⁻¹

Símbolos y abreviaturas de uso común empleados en este trabajo

<i>Símbolo</i>	<i>Significado</i>	<i>Unidades</i>
A	Absorbancia	
a	Actividad	
C	Concentración	mol/l
C _m	Concentración de una disolución madre	mol/l
f	Frecuencia	MHz
f _i	Intensidad relativa de la componente de un decaimiento	
I	Fuerza iónica	mol/kg
k	Constante de desactivación de fluorescencia	s ⁻¹
K _a	Constante de disociación de un ácido	
K _w	Constante de disociación del agua	
l	Paso óptico	cm
m	Pendiente de la recta de regresión lineal	
m _s	Masa de gel hinchado en el equilibrio	g
m ₀	Masa de gel seco	G
M _w	Peso molecular	g/mol
n	Índice de refracción	
	Ordenada en el origen de la recta de regresión lineal	
N	Tamaño de una muestra estadística	
	Porcentaje de bloques de memoria en uso/discriminados	
pH	Logaritmo decimal de la concentración de protones	
pK _a	Logaritmo decimal de la constante de disociación de un ácido	

<i>Símbolo</i>	<i>Significado</i>	<i>Unidades</i>
R	Resolución	ps
R^2	Coeficiente de correlación de una regresión lineal	
R_0	Radio de Förster	Å
S	Grado de hinchamiento	g/g
	Luz parásita	
S^2_R	Varianza muestral	
t_s	Tiempo de estabilización	días
T	Transmitancia	
$t_{n,1-\alpha}$	Estadístico t-Student	
T (ΔT)	Período de una señal	ns
Z_i	Número de unidades de carga del ión i	
D(t)	Decaimiento de una muestra	
E(t)	Decaimiento de la lámpara	
FWHM	Full width at half-maximum	
I(t)	Modelo de decaimiento exponencial	
IEM	Interferencia Electromagnética	
IRF	Instrument Response Function	
SG	Filtro tipo Savitzky-Golay	
TCSPC	Time-Related Single Photon Counting	
W-SG	Filtro tipo Savitzky-Golay con ventana de Parzen	
α	Factor preexponencial	
	Grado de ionización	
γ	Coeficiente de actividad	
δ	Delay/Ancho de pulso	ns
ε	Coeficiente de extinción molar	$M^{-1}cm^{-1}$
Λ	Ancho espectral	nm
λ	Longitud de onda	nm
μ	Media de una población estadística	
	Número de eventos por ciclo de excitación	
ν	Fracción en volumen	
ρ	Densidad	g/cm^3
σ^2	Varianza de una población estadística	
τ	Tiempo de vida de fluorescencia	ns
Φ	Rendimiento cuántico de fluorescencia	
ϕ	Número de puntos de entrecruzamiento	
χ^2	Parámetro de interacción de Flory-Huggins	
χ^2_n	Estadístico Chi-cuadrado	
Ω	Ventana de tiempos	ns

*Quien tiene un porqué para vivir
puede soportar casi cualquier cómo.*

Friedrich Nietzsche

CAPÍTULO 1. OBJETIVOS

Este trabajo ha surgido de la iniciativa de ampliar la caracterización de un tipo de hidrogeles de polielectrolito con capacidad para regular el pH de la disolución en que se encuentran. Un grupo de investigación de la Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED, Madrid) nos facilitó las muestras que hemos empleado. Dicho grupo ha invertido varios años en la síntesis y caracterización de estos hidrogeles. Nosotros hemos partido del marco teórico por ellos propuesto para proponer un método experimental que permita ampliar el conocimiento y la caracterización de estos materiales.

La cuestión principal que suscita nuestro trabajo es la determinación del pH en el interior del hidrogel, una característica ligada a su capacidad reguladora, pero que no puede medirse directamente por técnicas macroscópicas. Considerando la experiencia y los trabajos previos del Grupo de Polímeros del Departamento de Ciencia e Ingeniería de Materiales e Ingeniería Química de esta Universidad, se nos propuso dar respuesta a esta cuestión desde una solución basada en técnicas de espectroscopía de fluorescencia.

Después de analizar varias alternativas y para dar un mayor aprovechamiento a los recursos disponibles, ***el objetivo principal del presente trabajo es la medida del pH interno en geles de polivinilimidazol a través de la medida de tiempos de vida de una sonda fluorescente sensible al pH.*** Este objetivo se articula en varios puntos, que iremos desarrollando a lo largo del presente trabajo:

1. Partir de un *modelo teórico para el hinchamiento de los hidrogeles* que permita relacionar sus propiedades características con el pH y sus variaciones en el entorno.
2. *Caracterizar y optimizar un equipo* con capacidad para obtener tiempos de vida de fluorescencia a través de medidas con resolución temporal.
3. Integrar el uso de este dispositivo experimental en un *método de caracterización fofotísica de sondas fluorescentes idóneas para correlacionar los cambios de pH* ocurridos en el gel con las propiedades temporales de dichas sondas.

*Debe haber un mundo ideal,
una especie de paraíso matemático
donde todo sucede como en los libros de texto.*
Bertrand Russell

CAPÍTULO 2. FUNDAMENTO TEÓRICO

Este capítulo presenta, de forma resumida, los principios teóricos y los modelos que sirven de marco al presente trabajo. Consta de una primera introducción al equilibrio químico, para definir los conceptos fundamentales (equilibrio ácido-base, pH, efecto regulador). Presenta el modelo de hinchamiento de geles que se ha utilizado en la caracterización de los hidrogeles de poli-(N-vinilimidazol) y propone algunas expresiones útiles para los cálculos experimentales. Finalmente, incluye un desarrollo de la teoría básica de la fluorescencia para fundamentar el uso de la espectroscopía de fluorescencia en la caracterización del grado de hinchamiento de hidrogeles.

2.1. Equilibrio químico

En un proceso químico, el equilibrio químico es el estado en el que las actividades químicas o las concentraciones de los reactivos y los productos no tienen ningún cambio neto en el tiempo. Sea la ecuación reversible:



De acuerdo con el principio de la ley de masas (propuesto por Guldberg y Waage^[2,18-20]), cuando se alcanza el equilibrio, las velocidades de la reacción directa y de la reacción inversa se igualarán. Teniendo en cuenta el Principio de Le Chatelier, podemos definir la ecuación de equilibrio como:

$$K = \frac{a_C^c a_D^d}{a_A^a a_B^b} \quad [2.2]$$

Donde a_i representa las actividades de los productos/reactivos. La actividad es proporcional a la concentración: $a_i = \gamma_i C_i$. Esta constante de proporcionalidad es el coeficiente de actividad. Por tanto podemos reescribir la constante de equilibrio como:

$$K = \frac{\gamma_C^c \gamma_D^d [C]^c [D]^d}{\gamma_A^a \gamma_B^b [A]^a [B]^b} = K_\gamma K_c \quad [2.3]$$

2.1.1. Equilibrio electroquímico. Modelo de Debye-Hückel

En 1923, Debye y Hückel^[16] desarrollaron un modelo que permitía calcular los coeficientes de actividad teniendo en cuenta las interacciones de las cargas entre sí. Una de las hipótesis simplificadoras de este modelo consiste en calcular el potencial de interacción suponiendo el disolvente como un medio dieléctrico continuo y considerando que la interacción de las otras cargas puede aproximarse a una nube de carga equivalente.

En estos cálculos, el efecto de la nube de carga que rodea a un ion es el apantallamiento del potencial eléctrico de la carga. El espesor característico de esta nube de carga viene dado por la distancia de Debye:

$$r_D = \left(\frac{\epsilon_r \epsilon_0 RT}{2F^2 C_0} \right)^{1/2} \quad [2.4]$$

En esta ecuación, $\epsilon = \epsilon_r \epsilon_0$ es la constante dieléctrica del disolvente; R la constante universal de los gases; T la temperatura; $F = N_A \cdot e$ es la constante de Faraday y C_0 es la concentración molar del electrolito.

Por otra parte, definimos la fuerza iónica de una disolución como:

$$I = \frac{1}{2} \sum_i Z_i^2 \cdot m_i \quad [2.5]$$

El modelo de Debye-Hückel establece una relación entre la fuerza iónica y el coeficiente de actividad. Esta relación se conoce como la **Ley límite de Debye-Hückel**:

$$\log_{10} \gamma_{\pm} = -|Z_+ Z_-| A \sqrt{I} \quad [2.6]$$

En esta expresión A es un parámetro relacionado con la distancia de Debye cuyo valor es $A=0,509$ cuando la fuerza iónica se calcula en términos de molalidad. Esta ley límite se cumple con bastante precisión para disoluciones diluidas ($C < 10^{-4} M$), especialmente para electrolitos 1:1 (monovalentes). Experimentalmente se encuentran desviaciones de esta relación lineal a concentraciones moderadas, ya sea por el tipo de electrolito o por las interacciones que aparecen entre los iones, dando lugar a asociaciones que cargas que no quedan explicadas por el modelo.

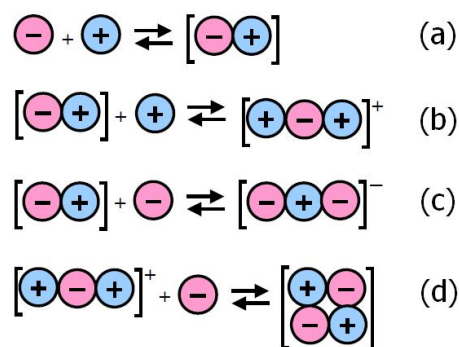


Figura 2.1.1. Posibles asociaciones de carga

Cuando la fuerza iónica es elevada, se puede introducir una modificación de la ley límite, donde B es una medida de la proximidad de los iones y puede considerarse un parámetro empírico ajustable (por ejemplo, $B \approx 1$ para el agua a 25 °C):

$$\log_{10} \gamma_{\pm} = -\frac{|Z_+ Z_-| A \sqrt{I}}{1 + B \sqrt{I}} \quad [2.7]$$

En las condiciones en que es válido el modelo de Debye-Hückel podemos suponer que los coeficientes de actividad son constantes y podemos simplificar nuestros cálculos del equilibrio empleando exclusivamente la constante de equilibrio de concentraciones para estudiar el equilibrio de una reacción:

$$K_c = \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b} \quad [2.8]$$

Esta constante depende de variables como la temperatura o la presión. En nuestro trabajo vamos a emplear algunas disoluciones ácidas poco diluidas ($C \sim 10^{-3}M$), donde es posible que la hipótesis antes presentada se vulnere, dando lugar a resultados que difieran de los esperados. En el momento oportuno indicaremos estos casos y el tratamiento que daremos a los resultados derivados.

2.1.2. Constantes de disociación y pH

Cuando el disolvente empleado es el agua, podemos extender de forma sencilla los conceptos anteriores para definir nuevos parámetros que resultan de gran utilidad en la caracterización de las sustancias en relación a su comportamiento en disolución como ácidos o bases.

Un ácido, en el sentido de Brønsted-Lowry^[4,9], es una sustancia capaz de ceder protones, dando lugar a su base conjugada:



Del mismo modo, una base, en el sentido de Brønsted-Lowry, es una sustancia capaz de aceptar protones:



Si en el equilibrio las reacciones están prácticamente desplazadas a la derecha, se habla de ácidos y bases fuertes, respectivamente. Por el contrario, si las reacciones anteriores ocurren sólo parcialmente en el equilibrio, se habla de ácidos y bases débiles. De esta forma, podemos definir las constantes de disociación ácida (K_a) y básica, respectivamente, como:

$$K_a = \frac{[A^-][H^+]}{[AH]} \quad [2.11]$$

$$K_b = \frac{[BH]}{[B^-][H^+]} \quad [2.12]$$

Si ahora consideramos la hidrólisis o autoionización del agua:



Definimos la constante de ionización del agua como:

$$K_w = K_a K_b = [H_3O^+][OH^-] \quad [2.14]$$

Habitualmente se simplifica la terminología sustituyendo el ion hidronio (H_3O^+) por H^+ , aunque se sabe que el protón no se encuentra como especie libre en disolución. También resulta habitual encontrar la referencia: $K_w = 10^{-14}$, lo que resulta cierto a una temperatura de 25 °C. A una temperatura distinta, el valor de esta constante será también distinto, ya que depende, fundamentalmente, de la presión y de la temperatura^[17].

En general, los valores de las constantes de equilibrio se mueven en un intervalo de varios órdenes de magnitud, por lo que resulta complejo manejar estos resultados. En 1909, el químico danés Sørensen ^[21] definió el potencial hidrógeno (pH) como el logaritmo decimal negativo de la concentración molar (más exactamente, de la actividad molar) de los iones hidrógeno. Esta escala logarítmica resulta de gran utilidad y será la nomenclatura habitual que emplearemos en lo sucesivo.

2.1.3. Disoluciones tampón

Una disolución tampón (amortiguadora, reguladora o buffer) es la mezcla, en concentraciones relativamente elevadas, de un ácido débil y su base conjugada, capaz de mantener estable el pH de una disolución frente a la adición de cantidades relativamente pequeñas de ácidos o bases fuertes. Por efecto del ion común, cuando un ácido y su base conjugada están ambos presentes en una disolución, al añadir un ácido o una base fuerte,

(que se disocian totalmente) contribuyen con iones que desplazan el equilibrio (principio de Le Chatelier), manteniendo el valor de pH sin grandes variaciones.

Cada sistema amortiguador tiene un rango efectivo de pH, el cual dependerá de la constante de equilibrio del ácido o base empleados. Al final de este trabajo, en el Apéndice A.4, presentamos información detallada sobre la composición de varios tampones comerciales.

2.1.4. Ecuación de Henderson-Hasselbach

Tomando en cuenta las consideraciones anteriores, la concentración de iones H^+ puede relacionarse con la concentración de ácido débil y la concentración de la sal debida a la disociación total del ácido fuerte:

$$[H^+] = K_a \frac{C_a - \Delta}{C_b + \Delta} \quad [2.15]$$

Donde $\Delta = [H^+] - [OH^-]$. Ahora bien, si $C_a \approx C_b$ y $C_a + C_b \gg |\Delta|$, resulta válida la aproximación:

$$[H^+] = K_a \frac{C_a}{C_b} = K_a \frac{[AH]_{añadido}}{[A^-]_{tampón}} \quad [2.16]$$

Tomando logaritmos decimales negativos (operador p de Sørensen) obtenemos la ecuación de Henderson-Hasselbach:

$$pH = pK_a + \log_{10} \frac{[A^-]_{tampón}}{[AH]_{añadido}} \quad [2.17]$$

Aparentemente, esta ecuación es la misma (en forma logarítmica) que la de la constante de disociación ácida que se obtiene directamente al aplicar la ley de acción de masas. Sin embargo, ya hemos visto que encierra de manera implícita algunas aproximaciones importantes. Suponemos que la concentración del ácido y su base

conjugada en el equilibrio seguirán siendo los mismos que su concentración formal. Despreciamos, por tanto, la disociación del ácido, la hidrólisis de la base y la disociación del agua de la disolución.

Los errores se harán más considerables cuando se trate de ácidos o bases fuertes, disoluciones muy diluidas ($C < 1\text{mM}$) o muy concentradas ($C > 1\text{M}$), o cuando la relación de concentraciones entre el ácido y la base sea muy dispar (100:1). Además, como sólo tiene en cuenta el cociente de concentraciones, esta ecuación tampoco tiene en cuenta el factor de dilución (el resultado sería igual para un volumen de 1ml como para 1 litro).

2.1.5. Valoración ácido-base

Denominamos neutralización a la reacción de un ácido con una base. Al definir anteriormente ácido y base según la teoría de Brønsted-Lowry, ahora podremos decir que la neutralización es una reacción ácido-base entre el ácido conjugado y la base conjugada del disolvente anfiprótico. En disolución acuosa, la transferencia del ion H^+ se realiza desde el ion hidronio al ion hidroxilo.

El procedimiento analítico por el cual se neutraliza un ácido con la adición progresiva de volúmenes de una base (o viceversa) se llama valoración. Esta técnica permite obtener los puntos de equivalencia, que son los valores de pH para los que la concentración de valorante es igual a la del analito que se está valorando. Experimentalmente, estos puntos de equivalencia se corresponden con los puntos de inflexión de la variación que experimenta el pH con la adición del ácido o base valorante (neutralizador). En el capítulo 3 se desarrollan dos apartados de interés que complementan esta breve explicación: la medición del pH por métodos potenciométricos (apartado 3.1.3) y la valoración espectrofotométrica (apartado 3.2.4). Asimismo, en los apéndices A.3 y A.4 se recoge información complementaria sobre la aplicación de estos conceptos.

2.2. Hinchamiento de geles

Una vez presentados los conceptos fundamentales sobre el equilibrio químico y su aplicación en la determinación del pH y las constantes de disociación ácido-base, este apartado está dedicado a la exposición del modelo propuesto de hinchamiento de geles y

su verificación experimental. Sirviéndose de modelos anteriores y de los resultados publicados en la literatura [29-30,40-43,46], el Departamento de Ciencias y Técnicas Fisicoquímicas de la Facultad de Ciencias de la Universidad a Distancia (UNED) ha presentado un modelo de hinchamiento de geles cuyo contraste experimental ha sido puesto como uno de los objetivos fundamentales del presente trabajo.

Por tanto, en primer lugar presentamos un resumen de la teoría de hinchamiento de geles que conduce al modelo propuesto. Posteriormente derivaremos las expresiones necesarias para la determinación experimental de los parámetros de hinchamiento. En apartados posteriores, relacionaremos estos parámetros con los parámetros fotofísicos característicos que hemos elegido para contrastar experimentalmente el modelo propuesto.

2.2.1. Introducción

En materiales poliméricos, *un gel es una estructura polimérica entrecruzada, que por acción de un líquido experimenta un cambio de volumen (hinchamiento), permaneciendo insoluble y conservando su forma original*. Si el hinchamiento se produce por acción del agua, se denominan hidrogeles.

Los hidrogeles son sistemas que modifican su volumen hasta alcanzar el equilibrio fisicoquímico, en respuesta a diferentes factores como la temperatura, el pH, el campo eléctrico externo o la fuerza iónica de las especies en disolución. Los hidrogeles poseen un carácter hidrófilo debido a la presencia en su estructura molecular de grupos afines al agua (por ejemplo, -OH, -COOH, -CONH₂, -CONH, -SO₃H). Finalmente, su elasticidad dependerá, entre otros factores, del carácter hidrófilo de los monómeros y la densidad de entrecruzamiento.

Este comportamiento característico sumado a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, naturaleza inerte, propiedades mecánicas, resistencia química y térmica, permiten que sean utilizados en diversas aplicaciones científicas e industriales. Los hidrogeles han encontrado multitud de aplicaciones en el ámbito biosanitario: lentes de contacto, sistemas de liberación controlada de fármacos, electrodos para diagnóstico clínico en electroencefalografía y electrocardiografía, apósitos para quemaduras o heridas de difícil curación, músculos artificiales, biosensores (pH, temperatura o concentración de metabolitos) [22-28,31-37,45].

Un grupo de hidrogeles muy interesante es el de los polielectrolitos: hidrogeles que contienen en sus unidades monoméricas grupos con carácter iónico o que pueden ser ionizados [29-30]. Pueden ser aniónicos, catiónicos, anfóteros o zwitteriónicos. Un subgrupo particular de hidrogeles iónicos son los hidrogeles neutros, con grupos que pueden comportarse como ácidos o bases débiles, en presencia del pH adecuado. Este tipo de geles sufre una gran variación en su hinchamiento como respuesta a las variaciones en el pH de la disolución y, por lo tanto, se les conoce como geles sensibles al pH.

Un ejemplo de este último tipo de hidrogeles es el poli(N-vinilimidazol) (PVI), que estudiaremos en este trabajo. En soluciones ácidas, los grupos funcionales imidazol se comportan como bases débiles y dependiendo del pH de la disolución, los geles PVI son sistemas neutros o iónicos.

2.2.2. Modelo de hinchamiento de geles de polielectrolito

El modelo de hinchamiento de geles considerado en este trabajo parte de la suposición de que el hidrogel se comporta como una membrana semipermeable, con unidadesceptoras de carga fijas (son grupos funcionales de los monómeros de cadena) y un electrolito que puede atravesar la membrana hasta que se produzca un equilibrio en la presión osmótica. A este comportamiento se le conoce como efecto o equilibrio de Donnan.

Aplicando este modelo de membrana semipermeable [3,5,25,33,36,38] al hinchamiento de un gel de polielectrolito, recurrimos a la teoría de Flory-Rehner, que nos permite cuantificar las tres contribuciones a tener en cuenta: la mezcla del disolvente y las cadenas del gel (Π_{MEZ}), la distribución no uniforme de las cargas móviles entre el interior y el exterior del gel (Π_{ION}) y la energía de deformación elástica de la red polimérica (Π_{EL}).

$$\sum \Pi_i = \Pi_{MEZ} + \Pi_{ION} + \Pi_{EL} = 0 \quad [2.18]$$

La contribución de mezcla puede expresarse a partir de la ecuación de Flory-Huggins, donde recordemos que v_2 es la fracción en volumen de hidrogel y χ es el parámetro de interacción entre el disolvente y el gel:

$$\Pi_{MEZ} = -\frac{RT}{V} [\ln(1 - v_2) + v_2 + \chi v_2^2] \quad [2.19]$$

La contribución iónica será proporcional a la diferencia de concentración entre las cargas móviles dentro y fuera del gel, ya que en el interior del gel son atrapadas por los contraiones presentes en las cadenas del gel. Si la relación entre cargas es 1:1, la contribución iónica será proporcional a la concentración de cargas fijas:

$$\Pi_{ION} = RT \frac{f \rho_2 v_2}{M_0} \quad [2.20]$$

En la expresión anterior, f es la fracción molar efectiva de monómeros con carga, ρ_2 es la densidad del hidrogel, v_2 es la fracción en volumen de hidrogel y siendo M_0 el peso molecular de una unidad monomérica con carga. Conviene tener presente que este modelo supone una distribución homogénea de las cargas fijas en el hidrogel y un comportamiento ideal de los iones libres en la disolución.

Finalmente tenemos que derivar una expresión para la contribución por la deformación elástica de la red. Las teorías sobre la elasticidad de las redes poliméricas descansan sobre dos supuestos básicos:

- las interacciones entre las cadenas son independientes del estado de deformación (la energía libre elástica de la red es la suma de las energías libres elásticas de cada una de las cadenas);
- se ignoran las interacciones del volumen excluido (la distribución de los extremos de cadena dentro de la red elástica es gaussiana).

Podemos utilizar dos modelos alternativos ^[27,39,44] cuyas diferencias residen en la forma de trasladar al nivel macroscópico las propiedades estadísticas de las cadenas consideradas independientemente.

El **modelo de red fantasma** supone que los puntos de entrecruzamiento fluctúan en torno a una posición, independiente de la deformación producida, deformándose de manera afín a la macroestructura. Según este modelo, la contribución introducida por la deformación elástica sería:

$$\Pi_{EL}^{ph} = -RTv_e \left(1 - \frac{2}{\phi}\right) v_2^{1/3} v_{2r}^{2/3} \beta \quad [2.21]$$

El **modelo de red afín** supone que no hay fluctuaciones en los puntos de entrecruzamiento debido a la interacción (*entanglement*) entre cadenas vecinas, deformándose de manera afín a la macroestructura. La contribución elástica resultaría ahora:

$$\Pi_{EL}^{aff} = -RTv_e \left(v_2^{1/3} v_{2r}^{2/3} - \frac{2}{\phi} v_2\right) \beta \quad [2.22]$$

En estas ecuaciones, v_e es la densidad de entrecruzamientos ($v_e = \rho_2 / \bar{M}_c$), siendo \bar{M}_c el peso molecular promedio entre puntos de entrecruzamiento y β es un parámetro que corrige las desviaciones gaussianas de los desplazamientos y fluctuaciones de las cadenas.

2.2.3. Cálculo del pH en el interior de un gel

Llamamos C a la concentración molar efectiva de unidades aceptoras de protones:

$$C = \frac{m_0}{M_0 V_T} \quad [2.23]$$

Donde m_0 es la masa de gel presente en un volumen V_T de disolución y M_0 es el peso molecular de una unidad monomérica con el grupo funcional aceptor de protones. Dentro de la disolución, el gel se hinchará hasta alcanzar un volumen V_G y quedará rodeado de un volumen V_S de disolución que llamaremos sobrenadante. En el equilibrio, la concentración molar de unidades aceptoras de protones en la fase del gel será:

$$C_G = \frac{m_0}{M_0 V_G} = \frac{v_2 \rho_2}{M_0} \quad [2.24]$$

Dentro del hidrogel, la fase líquida tendrá un volumen $(1 - v_2)V_G$, donde v_2 es la fracción volumétrica de polímero en el gel. El cociente volumétrico entre el estado inicial y el estado hinchado en el equilibrio lo podemos calcular a partir de:

$$\frac{V_T}{V_G} = \frac{C_G}{C} \quad [2.25]$$

El cociente volumétrico entre el sobrenadante y la fase del gel será:

$$\frac{V_S}{V_G} = \frac{C_G}{C} \sigma \quad [2.26]$$

Donde σ es la fracción de la disolución inicial que permanece en el sobrenadante una vez alcanzado el equilibrio de hinchamiento y que podemos relacionar con las otras variables:

$$\sigma = 1 - \frac{(1 - v_2)C}{C_G} \quad [2.27]$$

Imponiendo las condiciones de equilibrio al sistema, obtendremos tres tipos de ecuaciones que se corresponden con tres de las principales hipótesis de este modelo: a) igualdad de actividades de los electrolitos (sal y ácido); b) conservación de la electroneutralidad (tanto en el gel como en el sobrenadante); c) balance de masas para los electrolitos. Las ecuaciones resultantes son:

$$\left. \begin{aligned} [H^+]_G [A^-]_G &= [H^+]_S [A^-]_S \\ [M^+]_G [A^-]_G &= [M^+]_S [A^-]_S \end{aligned} \right\} \text{Igualdad de actividades} \quad [2.28]$$

$$\left. \begin{aligned} [A^-]_0 &= [H^+]_0 + [M^+]_0 - \frac{K_w}{[H^+]_0} \\ [A^-]_S &= [H^+]_S + [M^+]_S - \frac{K_w}{[H^+]_S} \\ [A^-]_G &= [H^+]_G + [PH^+] + [M^+]_G - \frac{K_w}{[H^+]_G} \end{aligned} \right\} \text{Electroneutralidad} \quad [2.29]$$

$$\left. \begin{aligned} [A^-]_G &= ([A^-]_0 - [A^-]_s \sigma) \frac{C_G}{C} \\ [M^+]_G &= ([M^+]_0 - [M^+]_s \sigma) \frac{C_G}{C} \end{aligned} \right\} \text{Balance de masas} \quad [2.30]$$

El término $K_w/[H^+]$ en las ecuaciones de electroneutralidad tiene en cuenta la presencia de los iones hidroxilo, contribución que no puede despreciarse en algunos casos, particularmente cuando $\text{pH} \sim 7$. Si ahora combinamos la ecuación [2.29] con la [2.30], obtenemos la siguiente expresión:

$$[A^-]_G = \left[[\tilde{H}^+]_0 + [M^+]_0 - ([\tilde{H}^+]_s + [M^+]_s) \sigma \right] \frac{C_G}{C} \quad [2.31]$$

La nomenclatura de la ecuación se ha simplificado utilizando: $[\tilde{H}^+]_x = [H^+]_x - K_w/[H^+]_x$ (nótese que no se ha eliminado la contribución de los iones hidroxilo). Aislando la concentración de protones del gel en el equilibrio de hinchamiento, podemos reescribir:

$$[H^+]_G = \frac{[H^+]_s [A^-]_s}{[A^-]_G} \quad [2.32]$$

Recurriendo a las expresiones anteriores, podemos finalmente determinar el pH en el interior del gel (alternativamente, en términos de la concentración):

$$[H^+]_G = \frac{[H^+]_s ([\tilde{H}^+]_s + [M^+]_s)}{\left[[\tilde{H}^+]_0 + [M^+]_0 - ([\tilde{H}^+]_s + [M^+]_s) \sigma \right] \frac{C_G}{C}} \quad [2.33]$$

Esta es la ecuación general que estábamos buscando [29-30], una expresión que relaciona el pH en el interior del gel con los valores iniciales y de equilibrio de pH y de las concentraciones de ácido y sal. Todos estos valores se pueden medir experimentalmente. Asimismo, en la ecuación intervienen parámetros característicos del gel que podemos obtener a partir de las medidas del grado de hinchamiento y de la estructura del gel.

En el caso particular en el que no se añade ninguna sal a la disolución y sólo se hincha el gel en presencia de una cierta cantidad de ácido, podemos simplificar aún más esta expresión:

$$[H^+]_G = \frac{[H^+]_s [\tilde{H}^+]_s}{\left[[\tilde{H}^+]_0 - [\tilde{H}^+]_s \sigma \right] \frac{C_G}{C}} \quad [2.34]$$

Dado que en el presente trabajo no se ha añadido ninguna sal a las disoluciones, esta última expresión será la que utilicemos para contrastar nuestros resultados.

2.2.4. Grado de ionización y constante de disociación

Si bien este modelo permite obtener el pH de equilibrio en el interior de un gel hinchado, también permite relacionar las medidas experimentales con los valores de la constante de disociación ácida y el grado de ionización. En primer lugar, definimos el grado de ionización (α) para un gel como la fracción de unidades aceptoras de carga que se encuentran protonadas en el gel:

$$\alpha = \frac{[PH^+]}{[P] + [PH^+]} = \frac{[PH^+]}{C_G} \quad [2.35]$$

Por la condición de electroneutralidad, sabemos que:

$$[PH^+] = [A^-]_G - [M^+]_G - [\tilde{H}^+]_G \quad [2.36]$$

Por otra parte, si restamos las ecuaciones del balance de masas y sustituimos:

$$[PH^+] = ([A^-]_0 - [M^+]_0) - ([A^-]_s - [M^+]_s) \sigma \frac{C_G}{C} - [\tilde{H}^+]_G \quad [2.37]$$

Utilizando las ecuaciones de electroneutralidad y sustituyendo $[PH^+]$:

$$\alpha = \frac{1}{C} \left([\tilde{H}^+]_0 - [\tilde{H}^+]_s \sigma \right) - \frac{[\tilde{H}^+]_G}{C_G} \quad [2.38]$$

Es importante observar una conclusión del modelo que sacamos a partir de esta última ecuación: el grado de ionización no depende explícitamente de la concentración de sal, sino tan sólo de los valores de pH y de la concentración del gel. Sin embargo, sabemos que el pH en el interior del gel sí depende de la concentración de sal, así que hay que tener cuidado a la hora de definir e interpretar los resultados.

Por otra parte, podemos relacionar la constante de disociación ácida K_a con el valor de pH en el interior del gel a partir de la ecuación de Henderson-Hasselbach:

$$pH_G = pK_a + \log_{10} \frac{[P]}{[PH^+]} \quad [2.39]$$

Ahora, si sustituimos el cociente $[P]/[PH^+]$ utilizando la definición del grado de ionización:

$$pK_a = pH_G - \log_{10} \frac{1 - \alpha}{\alpha} \quad [2.40]$$

Es interesante subrayar, tal como puede encontrarse en otros trabajos previos [22-24], las limitaciones prácticas que podemos encontrar a la hora de encontrar un perfecto acuerdo entre los valores experimentales y los cálculos que se desprenden de estas ecuaciones. No tomar en cuenta las actividades iónicas, las posibles desviaciones de la ley límite de Debye-Hückel o las suposiciones impuestas al modelo de hinchamiento del gel son algunas de las razones que podemos aducir para explicar una posible discrepancia entre el modelo y la realidad.

2.3. Espectroscopía de fluorescencia

En este apartado repasaremos los conceptos fundamentales relacionados con la fluorescencia y las técnicas de espectroscopía que hemos empleado en este trabajo. El objetivo de esta parte es dejar bien definidos los parámetros que más tarde emplearemos en la caracterización de los hidrogeles, así como facilitar una explicación que justifique el diseño de los montajes experimentales.

2.3.1. Luminiscencia

Mediante este término se describe cualquier proceso de emisión luminosa de origen no térmico. Abarca una gran cantidad de fenómenos, que pueden clasificarse atendiendo al origen de la fuente de energía que crea la emisión luminosa. En la tabla siguiente aparece esta clasificación, junto con algunos ejemplos históricos de cada proceso.

<i>Proceso</i>	<i>Fuente / Origen</i>	<i>Ejemplos</i>
Fotoluminiscencia	Radiación (luz)	Sulfato de bario (V. Cascariolo, Bolonia, 1603) Sulfato de quinina (J. Herschel, Cambridge, 1845)
Quimioluminiscencia	Reacción química	Luminol (H.O. Albrecht, Alemania, 1928)
Electroluminiscencia	Corriente eléctrica	Sulfuro de cinc (G. Destriau, París, 1936)
Triboluminiscencia	Fuerza mecánica	Azúcar (R. Boyle, Oxford, 1663)
Sonoluminiscencia	Onda sonora	Cavitación por ultrasonidos (H. Frenzel, H. Schultes, Colonia, 1934)
Radioluminiscencia	Reacción nuclear	Pechblenda (M. Curie, París, 1903)

Tabla 2.3.1. Ejemplos de descubrimientos de fenómenos luminiscentes

Dentro de los procesos de fotoluminiscencia (originada por la absorción de una radiación electromagnética de una determinada longitud de onda), podemos distinguir dos procesos fundamentales: la fluorescencia y la fosforescencia. En una primera aproximación podríamos establecer una distinción entre ambos fenómenos por el tiempo de vida del proceso. Típicamente, los tiempos de vida de fluorescencia están en el rango de los nanosegundos, mientras que en la fosforescencia pueden ir desde los microsegundos hasta los minutos. Sin embargo, esta diferencia es sólo la consecuencia de dos procesos de

emisión cuyas transiciones al estado fundamental del sistema siguen mecanismos distintos.

2.3.2. Apuntes históricos sobre la fluorescencia

A mediados del siglo XVI aparecen algunos comentarios sobre una planta llamada “*coatli*”, utilizada en infusiones por los aztecas para tratar afecciones renales. El médico español Nicolás Monardes¹ y el franciscano Bernardino de Sahagún dan cuenta de este descubrimiento, indicando el color azulado (*matlali*, en azteca) que aparece en el agua de la infusión. Especialmente durante los siglos XVI y XVII, esta planta es usada en Europa para tratar infecciones de orina y problemas renales. Es conocida en este tiempo como *Lignum nephriticum*, aunque se ignoraba el origen del fenómeno que producía el color azulado. A comienzos del siglo XX fue identificada esta planta como *Eysenhardtia polystachya*, conocida comúnmente como *palo dulce* o *coatlillo*.

Entre las múltiples sustancias de interés contenidas en la planta, la madera del tronco contiene el flavonoide *coatlina B*. A pesar de ser un compuesto no fluorescente, mediante un complejo proceso de oxidación puede dar lugar a la *matlalina*, un compuesto fluorescente con una fuerte emisión azulada y un elevado rendimiento cuántico.

A mediados del siglo XIX, John Herschel hace las primeras observaciones sobre el sulfato de quinina, aunque es George Gabriel Stokes quien consigue observar que la fluorescencia del sulfato de quinina sólo se produce cuando es iluminada por luz ultravioleta; estableciendo así mismo la regla del desplazamiento de la emisión con respecto a la absorción (que llevará su nombre). Aunque hay que esperar a la primera mitad del siglo XX para tener una descripción rigurosa de los procesos que tienen lugar en el fenómeno de la fluorescencia.

¹ «[...] en echando el palo, dentro de media hora se comienza a poner el agua con un color azul muy claro, y quanto mas va, mas azul se torna, con ser el palo de color blanco. Desta agua beuen a la continua, y con ella aguan el vino, y haze muy maravillosos y manifestos efectos [...] No tiene el agua mas sabor que sino se vudiesse echado en ella cosa alguna, porque el palo no le inmuta nada». N. Monardes, *Historia medicinal de las cosas que se traen de nuestras Indias Occidentales*, Sevilla, 1584).

2.3.3. Transiciones electrónicas moleculares

A la hora de estudiar los niveles de energía asociados al movimiento de las moléculas, podemos distinguir, en principio, tres niveles: movimientos rotacionales (debidos al giro de la molécula en torno a su centro de gravedad); movimientos orbitales (transiciones de los electrones en los orbitales moleculares de enlace) y movimientos vibracionales (debidos a las vibraciones de los orbitales de enlace).

Las transiciones electrónicas ^[11] en compuestos orgánicos pueden ser determinadas por espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis), ya que sus bandas de absorción están asociadas con transiciones electrónicas en la capa de valencia. Estas transiciones nos proporcionan información sobre la estructura de la molécula y determina muchas de sus propiedades, como el color. Las transiciones pueden producirse desde los diferentes tipos de orbitales: σ y π (enlazantes y antienlazantes) y no enlazantes (n) y pueden ser:

- Transiciones $\sigma \rightarrow \sigma^*$. Se presentan en todos los compuestos orgánicos. Son en general de gran energía (100nm-200nm) e intensidad.
- Transiciones $\sigma \rightarrow \pi^*$ y $\pi \rightarrow \sigma^*$. Son posibles sólo en compuestos insaturados. Son transiciones de baja intensidad en el UV lejano. Carecen de interés práctico.
- Transiciones $n \rightarrow \sigma^*$. Se presentan en compuestos con heteroátomos, generalmente en la región cercana a los 200nm. La intensidad es variable dependiendo de la naturaleza del orbital n .
- Transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$. Presentes en compuestos insaturados. En ausencia de conjugación, estas transiciones se presentan entre 100nm y 200nm. Dan lugar a bandas intensas que pueden aparecer en UV cercano si hay insaturaciones con enlaces conjugados.
- Transiciones $n \rightarrow \pi^*$. Presentes en compuestos insaturados con heteroátomos (grupos carbonilo, nitro, azo, tiocarbonilo). Suelen dar lugar a bandas débiles en la región UV cercana.

Los orbitales σ y σ^* son orbitales moleculares localizados a lo largo del eje de enlace de los átomos. Los orbitales σ generan una densidad electrónica elevada en la región internuclear teniendo un carácter fuertemente enlazante. Los orbitales σ^* presentan un plano nodal perpendicular al eje del enlace en la región internuclear y tienen carácter antienlazante.

En los orbitales π y π^* las regiones de mayor densidad electrónica corresponden a las zonas colaterales al eje del enlace. El carácter enlazante o antienlazante de estos orbitales es menos acentuado que el de los orbitales σ . Por último, los orbitales moleculares n tienen un acentuado carácter local y describen pares electrónicos libres asociados con heteroátomos. Tienen carácter no-enlazante.

En ocasiones se ha recurrido a los diagramas de niveles de energía de orbitales para explicar las transiciones de los compuestos orgánicos, aunque la complejidad de algunas moléculas o la existencia de otros mecanismos no hace siempre posible que ésta sea una herramienta sencilla de predicción del espectro de un determinado compuesto.

2.3.4. Hipótesis y aproximaciones convencionales en espectroscopía

Los siguientes puntos resumen las principales aproximaciones e hipótesis de trabajo que tienen por objeto dar una explicación razonable de las observaciones espectroscópicas [6-8] con un modelo conceptual abordable desde el punto de vista de la búsqueda de soluciones particulares para la ecuación de Schrödinger.

El **principio de Franck-Condon** establece que las transiciones electrónicas son esencialmente instantáneas en comparación con la escala de tiempo de los movimientos nucleares; por lo tanto, si la molécula pasa a un nuevo nivel de vibración durante la transición electrónica, este nuevo nivel de vibración será compatible con las posiciones nucleares y los momentos del nivel de vibración de la molécula en el estado de origen².

La **aproximación de Born-Oppenheimer** establece que pueden desacoplarse las contribuciones de los movimientos electrónico y nuclear (tratamiento de variables separadas en la solución de la ecuación de Schrödinger). Al ser la masa del núcleo mucho mayor que la de los electrones, su velocidad es, comparativamente, mucho más pequeña. De esta forma, el núcleo experimenta a los electrones como si estos fueran una nube de carga, mientras que los electrones sienten a los núcleos como si estos estuvieran estáticos.

² La consideración explícita del acoplamiento de los movimientos electrónico y nuclear (generalmente, a través de otro tipo de simplificaciones), se conoce como acoplamiento vibracional o acoplamiento electrón-fonón. Este acoplamiento tiene consecuencias perceptibles en las propiedades ópticas y magnéticas de algunas sustancias.

Se llama **Regla de Kasha** al principio fotoquímico que postula que en una molécula poliatómica la transición luminiscente al estado fundamental se realiza siempre desde el nivel vibracional de menor energía (fundamental) del estado excitado. Se trata de una regla empírica fundada en el hecho de que los procesos de relajación vibracional ($10^{-15} \div 10^{-12}$ s) son mucho más rápidos que los procesos de fluorescencia ($10^{-9} \div 10^{-7}$ s) y fosforescencia ($10^{-6} \div 10^3$ s).

2.3.5. Procesos característicos del estado excitado

Para que los procesos en el estado excitado tengan lugar, hemos visto los distintos tipos de transiciones electrónicas que pueden llevarse a cabo. La estructura química de cada molécula determinará el tipo de transiciones probables, los niveles de energía en que éstas pueden ocurrir y la posibilidad de que otros mecanismos intramoleculares e intermoleculares intervengan en las propiedades del estado excitado de las moléculas.

El proceso de absorción por el cual puede producirse una transición electrónica es un proceso estimulado por la energía del fotón incidente. Se establece una relación (que llamamos momento de transición) entre la probabilidad de una transición y la energía radiante. En términos macroscópicos decimos que la absorbancia es proporcional a la capacidad que una molécula tiene de absorber radiación de una determinada longitud de onda.

El proceso de absorción se produce muy rápidamente (aproximadamente en un femtosegundo) desde un nivel permitido de energía del estado fundamental (E_0) hasta un nivel permitido de energía del estado excitado (E_1), de forma que: $E_1 - E_0 = h\nu_{ABS}$; donde h es la constante de Planck y ν_{ABS} es la frecuencia de la radiación absorbida.

Si el fotón absorbido contiene más energía de la necesaria para una transición electrónica simple, el exceso de energía, por lo general, se convierte en energía vibracional y rotacional. Con luz ultravioleta o luz visible, los fluoróforos³ comunes suelen ser excitados a niveles de vibración superiores al nivel fundamental del primer estado excitado (o superiores). En un fluoróforo típico, la excitación con un amplio espectro de

³ Llamamos fluoróforo a la molécula o a la parte de una molécula capaz de emitir luz por un mecanismo de fluorescencia. A menudo se utiliza la palabra cromóforo, más general, para designar a la molécula o parte de ésta responsable de su color (para longitudes de onda dentro del rango del espectro visible).

longitudes de onda va a generar toda una serie de transiciones permitidas que pueblan los diferentes niveles de vibración energética de los estados excitados. Algunas de estas transiciones tienen un mayor grado de probabilidad que otras, y al combinarse se constituye el espectro de absorción de la molécula.

Inmediatamente después de la absorción de un fotón existen varios procesos que compiten entre sí (con probabilidades diferentes), pero lo más probable será la relajación al nivel más bajo de energía vibracional del estado excitado (conversión interna o relajación vibracional), que en general se produce en un tiempo inferior a un picosegundo.

Una molécula excitada puede permanecer en el estado singlete excitado por períodos del orden de nanosegundos antes de regresar de nuevo al estado fundamental. Si la relajación de este estado de larga duración se acompaña de la emisión de un fotón, el proceso se conoce formalmente como **fluorescencia**. Los niveles de vibración muy próximos de energía del estado fundamental, cuando se combina con la agitación térmica normal, producen una amplia gama de energías permitidas para la emisión de fotones. Como resultado, también la fluorescencia se observa normalmente como la intensidad de emisión de una banda de longitudes de onda.

Otro mecanismo es el **cruce entre sistemas**, un proceso no radiativo que implica una transición entre dos estados electrónicos con diferente multiplicidad de spin. Cuando un electrón en un estado fundamental singlete se excita a un nivel superior de energía, en principio, todos los electrones tienen su spin apareado (sincronizado con el que tenían en el estado fundamental). En un estado triplete, se invierte el spin cuántico. Esto es una transición no permitida que sólo resulta favorable cuando se superponen los niveles vibracionales de los dos estados excitados.

La desactivación radiativa desde un estado triplete excitado a un estado singlete es conocido como **fosforescencia**. Por tanto, la fosforescencia es una manifestación de un proceso de cruce entre sistemas.

Un fluoróforo en el estado excitado puede transferir su energía de excitación a otro cromóforo de forma no radiativa a través de una interacción de largo alcance. El modelo más ampliamente aceptado de **transferencia de energía** (Förster-Dexter) considera las interacciones entre las dos moléculas como la resonancia de dos osciladores eléctricos acoplados, mediante una aproximación semiclásica del modelo cuántico. En este tipo de transiciones no radiativas, la probabilidad de transferencia es inversamente proporcional

a la sexta potencia de la distancia: $k_{FRET} = (1/\tau_0)(R_0/r)^6$. R_0 es conocido como radio de Förster y es del orden de varios nanómetros.

El proceso de desactivación o **quenching** se deriva de una variedad de procesos intramoleculares e intermoleculares (reversibles e irreversibles) que compiten por inducir la relajación no radiativa de los electrones desde el estado excitado al estado fundamental. La mayoría de los procesos de quenching tienen como efecto una reducción del tiempo de vida y del rendimiento cuántico del fluoróforo. Un tipo de desactivación es el quenching dinámico o *quenching colisional*, en el que una molécula externa provoca la relajación por una transferencia de electrones, un acoplamiento spin-órbita o un cruce entre sistemas hacia un estado triplete. Un segundo tipo de mecanismo es el llamado *quenching estático* o de formación de complejos, que se produce cuando la especie fluorescente forma un complejo reversible en el estado fundamental.

La **fotodegradación** se produce cuando un fluoróforo pierde de forma permanente la capacidad de fluorescencia debido a procesos químicos fotoinducidos o a modificaciones covalentes.

En la tabla siguiente se muestra un cuadro-resumen de los procesos anteriormente descritos, indicando el tiempo característico de cada uno de ellos.

<i>Transición</i>	<i>Proceso</i>	<i>Constante</i>	<i>Escala de tiempo (s)</i>
S(0) → S(N)	Absorción (excitación)	Instantánea	10^{-15}
S(N) → S(1)	Conversión interna	k_{ci}	$10^{-14} \div 10^{-10}$
S(1) → S(1)	Relajación vibracional	k_{rv}	$10^{-12} \div 10^{-10}$
S(1) → S(0)	Fluorescencia	k_f	$10^{-9} \div 10^{-7}$
S(1) → T(1)	Cruce entre sistemas	k_{ic}	$10^{-10} \div 10^{-8}$
S(1) → S(0)	Quenching por relajación (no radiativo)	k_{qnr}	$10^{-7} \div 10^{-5}$
T(1) → S(0)	Quenching por relajación (no radiativo)	k_{qnr}	$10^{-3} \div 100$
T(1) → S(0)	Fosforescencia	k_p	$10^{-3} \div 100$

Tabla 2.3.1. Escala de tiempos de los procesos relacionados con el estado excitado

Una forma habitual de representar estos procesos es el diagrama de Jablonski. Los estados y subestados se representan por líneas horizontales. Las transiciones no radiativas se indican con flechas onduladas y las transiciones radiativas por flechas rectas.

Los estados fundamentales de vibración de cada estado electrónico se indican con líneas gruesas; los estados superiores de vibración con líneas más finas.

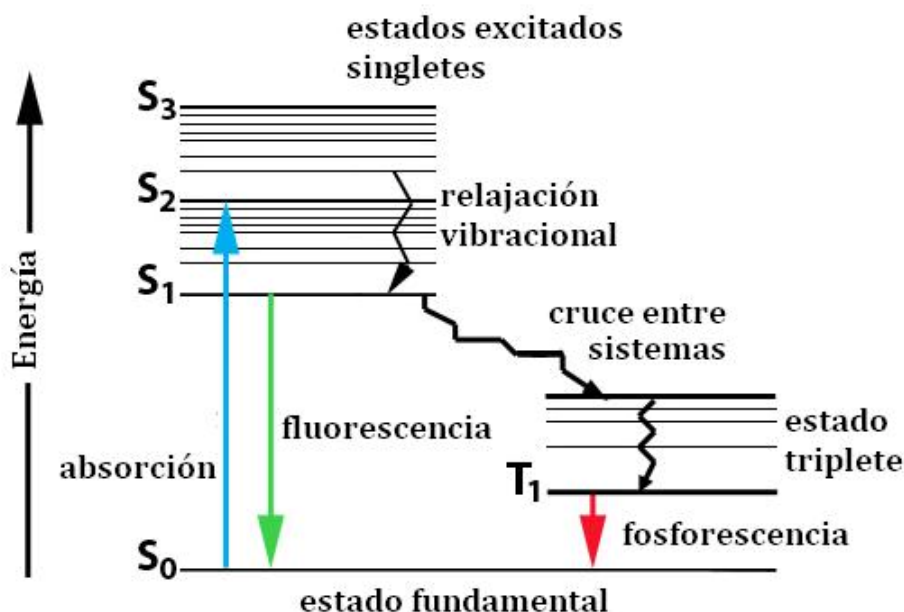


Figura 2.3.1. Diagrama de Jablonski, ilustrando los principales procesos

2.3.6. Propiedades relacionadas con la fluorescencia

Se llama **desplazamiento de Stokes** a la diferencia entre las posiciones espectrales de los máximos de las bandas de absorción y emisión de una misma transición electrónica, generalmente hacia mayores longitudes de onda.

Cuando un sistema absorbe un fotón, aumenta energía y entra en un estado excitado. Una forma para que el sistema se relaje es emitir un fotón. Cuando el fotón emitido tiene menos energía que el fotón absorbido, esta diferencia se llama desplazamiento de Stokes. Si el fotón emitido tiene más energía (por ejemplo, por la intervención de un fonón en una red cristalina), la diferencia de energía se llama desplazamiento anti-Stokes. En la práctica, el desplazamiento de Stokes se mide como la diferencia entre las longitudes de onda de los máximos de los espectros de excitación y de emisión.

Para muchos fluoróforos, la separación entre los niveles de energía vibracional es similar tanto para el estado fundamental como para el excitado, lo que resulta en un espectro de fluorescencia que se parece mucho a la imagen especular del espectro de

absorción. Esto se debe al hecho de que son igualmente probables las mismas transiciones para la absorción y la emisión. En ocasiones, como es el caso del sulfato de quinina una longitud de onda muy corta en la absorción implica una transición a estados excitados superiores, que rápidamente se relajan, pasando al primer estado excitado. Por consiguiente, la emisión está favorecida desde un único máximo, invalidando la regla de la imagen especular.

Existen varios parámetros fundamentales para describir las propiedades de las sustancias fluorescentes: el coeficiente de extinción molar (ϵ), el rendimiento cuántico (Φ), el tiempo de vida de fluorescencia (τ) y la anisotropía de fluorescencia.

El **coeficiente de extinción molar** se utiliza ampliamente en espectroscopía para convertir las unidades de absorbancia en unidades de concentración molar, ya que es la constante de proporcionalidad entre la absorbancia de una sustancia a una longitud de onda dada y su concentración molar para un paso óptico de 1cm.

El **rendimiento cuántico** es un indicador para medir la eficacia de la emisión de fluorescencia frente a todos los otros mecanismos que compiten por llevar al electrón al estado fundamental. Se expresa generalmente como la relación entre el número de fotones emitidos frente al número de fotones absorbidos. En otras palabras, el rendimiento cuántico representa la probabilidad de que un fluoróforo pase del estado excitado al estado fundamental emitiendo un fotón. Matemáticamente se expresa:

$$\Phi = \frac{k_{RAD}}{k_{RAD} + k_{NR}} \quad [2.41]$$

El **tiempo de vida de fluorescencia** es el tiempo característico que una molécula permanece en un estado excitado antes de volver al estado fundamental. Debido a que la transición al estado fundamental es directamente proporcional a la población del estado excitado, los decaimientos fluorescentes siguen una ley exponencial, lo que ha permitido desarrollar técnicas sofisticadas de espectroscopía y microscopía basadas en la medida del tiempo de vida del estado excitado. Denominamos tiempo de vida natural de un fluoróforo (τ_0) al tiempo de vida en ausencia de otros mecanismos ($\tau_0 = 1/k_{RAD}$). Cuando existen mecanismos no radiativos, el tiempo de vida se acorta:

$$\tau = \tau_0 \frac{1}{1 + \tau_0 \sum k_{NR}} \quad [2.42]$$

Cuando un fluoróforo se encuentra en entornos diferentes o se produce algún cambio en la especie fluorescente, el decaimiento no tiene un único tiempo de vida, sino que puede describirse mejor como la contribución de dos o más tiempos de vida. Entonces, el modelo de decaimiento será:

$$I(t) = I_0 \cdot \sum_{i=1}^n \alpha_i \cdot \exp(-t/\tau_i) \quad [2.43]$$

En esta expresión, α_i es el factor preexponencial, que se corresponde con la fracción de la amplitud del decaimiento correspondiente al tiempo de vida i -ésimo.

La **anisotropía de fluorescencia** es una medida de la respuesta selectiva de un fluoróforo a la radiación incidente en función de la orientación de su momento dipolar de transición. Esta propiedad permite obtener información acerca de la rigidez del entorno o de la forma y tamaño de un sistema (en el caso de las proteínas).

2.3.7. Factores que afectan a la fluorescencia

Hay una gran variedad de factores ambientales que afectan a la emisión de fluorescencia. Una de las características que hace interesante estudiar el comportamiento de las sustancias fluorescentes es su alto grado de sensibilidad a las interacciones que se producen en el entorno local durante la vida del estado excitado. Algunos factores que modifican las propiedades fluorescentes de una sustancia son:

La **estructura química**. La presencia de anillos aromáticos y ciertas estructuras con dobles enlaces favorecen la existencia de grupos fluorescentes.

La **rigidez estructural** favorece la fluorescencia, ya que reduce la probabilidad de relajación a través de la energía vibracional, aumentando la probabilidad de la transición al estado fundamental por vía radiativa.

La **polaridad del disolvente** produce el efecto solvatocrómico: un cambio en la posición, y a veces la intensidad, de una banda de absorción electrónica o de emisión, como consecuencia de un cambio en la polaridad del medio. El efecto solvatocrómico

puede manifestarse en un desplazamiento de las bandas espectrales a frecuencias más bajas (*efecto batocrómico* o desplazamiento al rojo) o a frecuencias más altas (*efecto hipsocrómico* o desplazamiento al azul).

La presencia de **iones** en el medio puede provocar el *quenching* de la fluorescencia, la formación de complejos o de reacciones en estado excitado que afectan a los procesos de absorción y de emisión fluorescente.

2.4. Sondas fluorescentes sensibles al pH

El uso de sondas fluorescentes presenta un particular atractivo por ser la fluorescencia una técnica muy sensible, de fácil manejo, eficaz y de respuesta rápida para detectar o monitorizar la concentración de moléculas específicas. Presentan una gran cantidad de aplicaciones biológicas ya que permiten trabajar a escala celular. Además, las técnicas de fluorescencia permiten utilizar fuentes con una gran eficiencia de excitación, aunque las cantidades de analito sean muy pequeñas, típicamente del orden de 1 μ M, o incluso por debajo.

2.4.1. Criterios de selección de sondas fluorescentes

Para cada aplicación analítica podemos establecer una serie de criterios que nos permitan seleccionar las sondas más adecuadas. En este apartado, tendremos sólo presentes aquellas propiedades fundamentales que son decisivas en la elección de una sonda sensible al pH en un determinado rango, con la que se quiere estudiar el hinchamiento de hidrogeles con grupos aceptores de protones en medio ácido. Desde este punto de vista, las alternativas deben cumplir los siguientes requisitos:

- Posibilidad de utilizar una sonda a **bajas concentraciones** para despreocuparse de las interacciones entre fluoróforos y de los fluoróforos con el entorno.
- Alta **solubilidad en agua**.
- **Estabilidad térmica y fotoquímica**, para que no provoquen un cambio indeseado de las propiedades fotofísicas.
- Posibilidad de **excitar** la sonda cerca de su **máximo de absorción** con las fuentes disponibles.
- **Sensibilidad a los cambios de pH** en el medio, dentro de un rango amplio.

- **Variación del tiempo de vida de fluorescencia** ante cambios en el pH del medio.

Existen sustancias químicas que varían sus propiedades colorimétricas en función del pH, de otros iones o moléculas, o incluso de cambios en la presión o en la temperatura del medio. Esta capacidad para alterar sus propiedades las hace especialmente útiles en la construcción de todo tipo de sensores [48,52]. Si nos centramos en las sondas fluorescentes sensibles al pH, podemos encontrar dos fenómenos que modifican sus propiedades fotofísicas:

Interacciones con las moléculas de disolvente o de la matriz polimérica. En el caso del disolvente, la concentración de protones es la responsable del cambio en la sonda. Las interacciones con la matriz polimérica suelen ser más complejas, ya que además de unidades de carga, existen grupos funcionales en la matriz que modifican las propiedades de la sonda.

Reacciones de transferencia de carga en el estado excitado. Las propiedades ácidas o básicas de una molécula que absorbe luz no son las mismas en el estado fundamental y en el estado excitado. Una causa puede ser la redistribución de la densidad electrónica por la excitación. El resultado es un cambio en la proporción y tiempo de vida de las especies fluorescentes en el estado excitado.

Dado que entre los objetivos del trabajo está utilizar una sonda fluorescente cuyo tiempo de vida sea sensible al pH, buscaremos entre aquellas sondas que puedan favorecer un mecanismo de transferencia de carga en el estado excitado. Esta situación complica, sin embargo, la interpretación de los resultados conforme a un modelo. Queda fuera de los objetivos de este trabajo proponer y validar un modelo concreto de transferencia de carga, si bien nos detendremos a comentar el caso más sencillo. Sirva como orientación para la práctica y como referencia en el caso de estudios posteriores.

2.4.2. Mecanismos de reacción en sondas fluorescentes sensibles al pH

Para advertir las diferentes propiedades que una sonda fluorescente sensible al pH puede tener dependiendo de si se encuentra en el estado fundamental o en el estado excitado, recurramos a un sistema binario. Consideremos una especie fluorescente A capaz de ceder un protón. En el estado fundamental puede seguir dos mecanismos: ceder un protón ($A \rightarrow B$) o pasar al estado excitado ($A \rightarrow A^*$). En el estado fundamental se da el

equilibrio ácido-base ($A \rightleftharpoons B$). La constante de disociación ácida se puede calcular con la ecuación de Henderson-Hasselbach:

$$pH = pK_a + \log_{10} \frac{[B]}{[A]} \quad [2.44]$$

En el estado excitado, A^* también puede seguir dos mecanismos: emitir un fotón y regresar al estado fundamental ($A^* \rightarrow A$) o ceder un protón dando lugar al equilibrio ácido-base ($A^* \rightleftharpoons B^*$), donde:

$$pH = pK_a^* + \log_{10} \frac{[B^*]}{[A^*]} \quad [2.45]$$

Comparando ambas expresiones, nos damos cuenta de que la probabilidad que tenga cada una de las transiciones en una determinada sonda dará lugar a diferencias más o menos significativas entre los estados fundamental y excitado. Gráficamente podemos ilustrar estos mecanismos mediante el llamado ciclo de Förster.

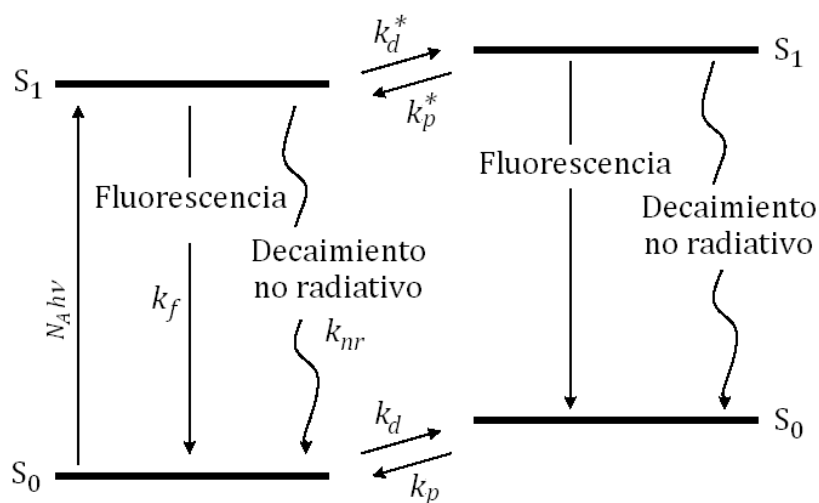


Figura 2.4.1. Ciclo de Förster para un sistema binario.

Uno de los ejemplos ^[55] de sistemas binarios estudiados es el decaimiento del 2-naftol ($pK_a = 9,5$; $pK_a^* = 2,8$). El decaimiento de las especies naftol (A) y naftolato (B) se rige por el sistema de ecuaciones:

$$\begin{cases} I_A(\lambda, t) = \alpha_1(\lambda) \cdot \exp(-t/\tau_1) + \alpha_2(\lambda) \cdot \exp(-t/\tau_2) \\ I_B(\lambda, t) = \beta_1(\lambda) \cdot \exp(-t/\tau_1) + \beta_2(\lambda) \cdot \exp(-t/\tau_2) \end{cases}$$

Cuando representamos los tiempos de vida en función del pH para el 2-naftol, observamos que varían en un intervalo próximo a $pK_a^* \pm 1,5$, permaneciendo constantes fuera de ese intervalo. Una tendencia similar se produce en los factores preexponenciales.

Si un sistema resultara más complejo que este modelo binario propuesto para el 2-naftol, lo que sí podríamos asegurar es que el decaimiento de esa sonda fluorescente tendría dos tiempos de vida variables en un intervalo próximo a su constante de disociación ácida. La relación entre la constante en el estado fundamental y el estado excitado determinaría el comportamiento asintótico de los parámetros del decaimiento (tiempos de vida y factores preexponenciales).

*Cuando emprendas tu viaje a Itaca
pide que el camino sea largo,
lleno de aventuras, lleno de experiencias.
Constantino Cavafis*

CAPÍTULO 3. MÉTODO EXPERIMENTAL

3.1. Instrumentación

Este apartado está dedicado a describir las características de los aparatos de medida empleados en la caracterización de las sondas fluorescentes y de los hidrogeles. En los sistemas comerciales y de uso estándar se especifican los principios generales de funcionamiento, así como las particularidades de los que se han empleado en este trabajo. En el apartado 3.2, dedicado a la metodología experimental, se indicarán las condiciones elegidas para las medidas que se llevaron a cabo.

3.1.1. Espectroscopía UV-Visible

Como ya hemos desarrollado en el capítulo anterior, las sustancias fluorescentes tienen también una región espectral que coincide con los niveles de energía en los que estos fluoróforos absorben la energía que luego puede dar lugar a la emisión fluorescente. Parte de este trabajo lo hemos centrado en la caracterización de las sondas fluorescentes por medio de sus espectros de absorción, ya que proporcionan información relevante de forma rápida y sencilla.

Para llevar a cabo las medidas utilizamos un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 14P de doble haz ^[74-75], que compara la absorbancia o transmitancia de una muestra con una referencia. En este tipo de espectrofotómetros suele haber dos fuentes de excitación: una para las longitudes de onda menores y otra para mayores longitudes de onda. La luz de la fuente pasa por un monocromador y de ahí el haz pasa por un *chopper* o un *beam splitter*, que producen dos haces de luz alternantes. Uno de ellos se dirige a la *celda de referencia* que contiene el blanco y el otro haz se dirige hacia la *celda de muestra*.

Los dos haces de luz, después de atravesar las celdas pueden nuevamente recombinarse, para obtener luego la señal correspondiente.

Estos sistemas de doble haz tienen la ventaja de que cualquier variación en la intensidad de la fuente, la eficiencia de la red de difracción, la reflectividad de los espejos, la fotosensibilidad del detector, afecta casi simultáneamente a los dos haces (la frecuencia de rotación del elemento divisor está entre 50 y 100 Hz). Otra de las ventajas es que permite la corrección automática de los espectros, además de múltiples combinaciones entre ellos (derivación, suma y resta de espectros).

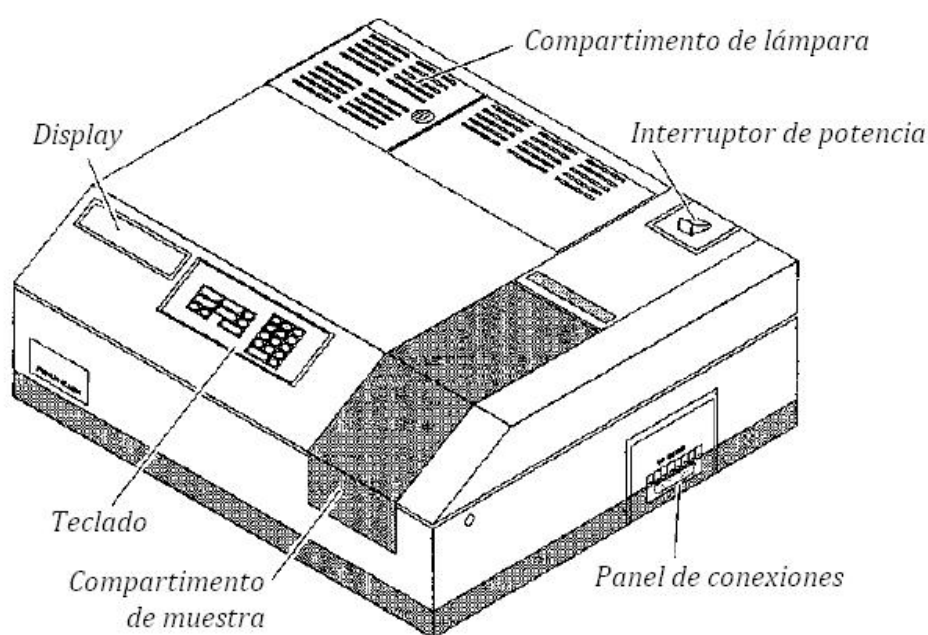


Figura 3.1.1. Representación de un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 14P

3.1.2. Espectroscopía de fluorescencia

En los siguientes apartados presentamos los principios de funcionamiento de los fluorímetros utilizados en este trabajo. En primer lugar, aunque su uso ha sido minoritario, el fluorímetro FLS 900CDT (Edinburgh Analytical Instruments) para medidas estacionarias de fluorescencia. Para la medida de tiempos de vida de fluorescencia se empleó el sistema provisto por PicoQuant GmbH, integrado por diversos elementos.

3.1.2.1. Elementos característicos de un fluorímetro

La mayoría de los fluorímetros comerciales, a pesar de la diversidad de modelos y aplicaciones, responden a un esquema de funcionamiento muy similar, donde una *fente de excitación* irradia una muestra en el interior de un compartimento cerrado (*cámara de muestras*) y cuya emisión fluorescente es recibida por un *fotodetector*. Para seleccionar las longitudes de onda de excitación y de emisión suele recurrirse a *monocromadores*. Finalmente, todos los elementos están interconectados y sincronizados a un sistema *hardware/software*, desde el que podemos controlar el funcionamiento de cada uno de los elementos, representar y almacenar los datos obtenidos.

En medidas estacionarias, los espectros se obtienen por la acumulación de cuentas a diferentes longitudes de onda, en cuyo caso, la fuente de excitación puede trabajar en modo continuo. Las lámparas de xenón [71] suelen ser habituales en estos casos, debido a su alta intensidad luminosa en todo el rango espectroscópico UV-Visible.

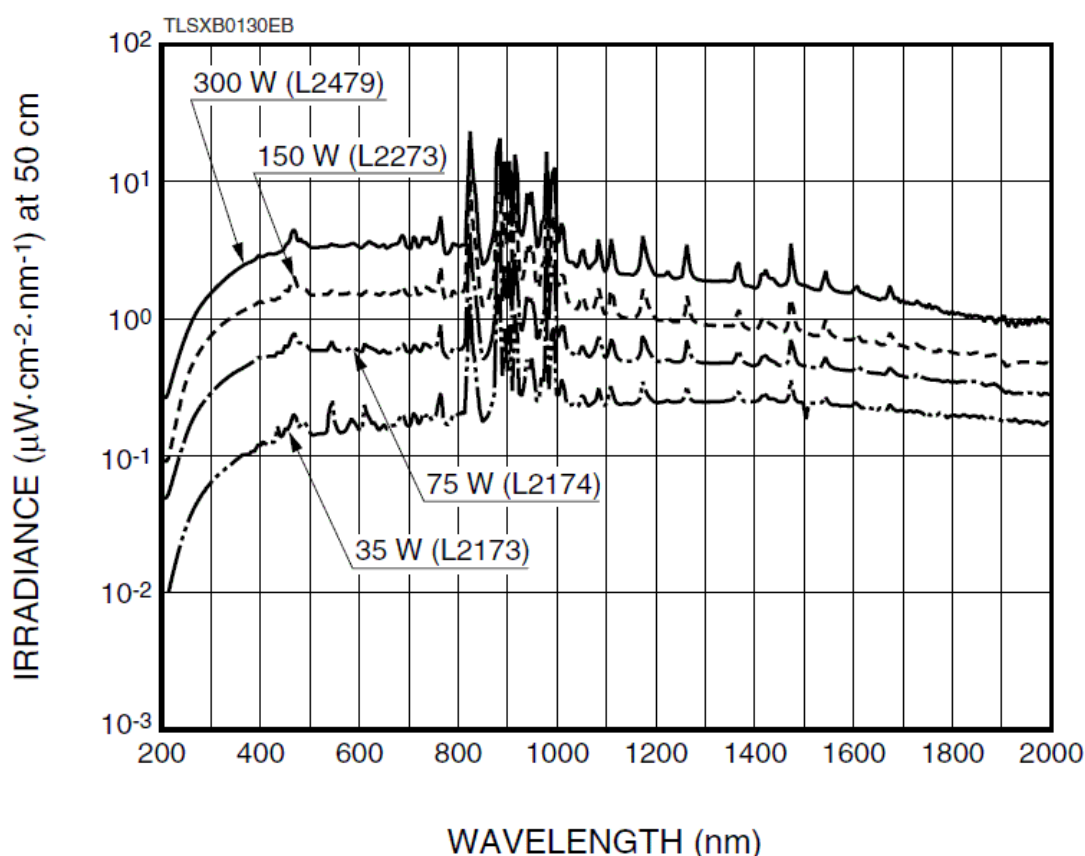


Figura 3.1.2. Irradiancia espectral de diversas lámparas de xenón (Hamamatsu Photonics)

Para las medidas con resolución temporal, es preciso que la *fente de excitación* sea una fuente pulsada cuya respuesta temporal sea muy estable y precisa. Los sistemas más

antiguos incorporan lámparas de descarga, en la que un gas de relleno sirve para provocar una descarga (hidrógeno o nitrógeno, habitualmente). Recientemente se ha extendido el uso de fuentes láser pulsadas. La ventaja es que son fuente casi monocromáticas, excitan a frecuencias mucho mayores y con pulsos más cortos e intensos, lo que aumenta la resolución y el tiempo de adquisición de datos.

La *cámara de muestras* suele ser el elemento fijo más versátil, dotado de un mayor número de accesorios para adecuar el sistema a todo tipo de muestras que deseemos medir. Consta de un comportamiento cerrado, que protege a la muestra de toda fuente de luz externa, y que mediante una óptica básica concentra el haz incidente sobre la muestra y lleva al detector (o detectores) el haz de emisión fluorescente. Para medidas de anisotropía, por ejemplo, se suele utilizar una geometría en "T", con dos detectores a 90° respecto del eje de excitación. En los fluorímetros comerciales suele incluirse un módulo básico con diferentes accesorios, manteniendo la óptica (asegurando que el camino óptico sea un valor constante y perfectamente calibrado), requisito básico en medidas de tiempos de vida.

Un *monocromador* es un sistema óptico que dispone de un servomecanismo que selecciona con precisión una banda estrecha de longitudes de onda. Existen varias configuraciones ópticas ^[6] (Littow, Ebert-Fastie, Monk-Gillieson), aunque una de las más empleadas en los fluorímetros convencionales es la llamada configuración Czerny-Turner. En esta configuración, la luz entra por una rendija que se encuentra en el foco de un espejo colimador. El haz colimado incide sobre una red de difracción controlada por un motor paso a paso, seleccionando un ancho espectral que es reemitido a una rendija de salida gracias a otro espejo colimador. Esta configuración tiene pequeñas variantes y en ocasiones se utilizan monocromadores con dos etapas Czerny-Turner.

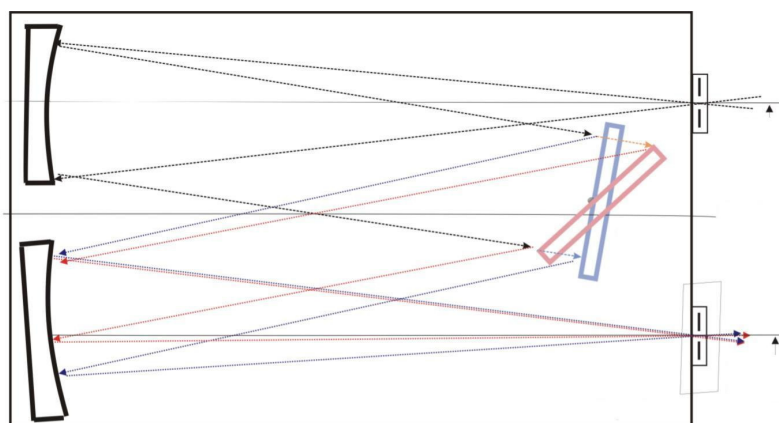


Figura 3.1.3. Esquema de un monocromador con una configuración tipo Czerny-Turner

Los *detectores* son elementos fotosensibles que permiten convertir la llegada de un fotón a un fotocátodo sensible en una corriente eléctrica capaz de ser tratada por un circuito electrónico de control. Existen diferentes alternativas, como los tubos fotomultiplicadores, los fotodiodos de avalancha o las *streak cameras* (éstas, sobre todo en microscopía de fluorescencia).

El tubo fotomultiplicador (PMT) está formado por un fotocátodo sensible a la luz que genera electrones cuando se expone a la luz [70]. Estos electrones se dirigen hacia un electrodo multietapa cargado llamado *dínodo*. La colisión de un fotoelectrón con cada etapa del dínodo produce varios electrones secundarios, creando un efecto avalancha. Este *efecto avalancha* hace posible la detección de un único fotón, ya que a la salida del ánodo del detector tendremos una corriente de electrones que genera un pulso medible de corriente. El nivel de cuentas de ruido (*dark noise*, *dark counts*) de un tubo fotomultiplicador tiene que ver con la corriente de electrones secundarios que pueden ser arrancados espontáneamente de una etapa del dínodo a una cierta temperatura (efecto termoiónico). De modo que al refrigerar los detectores PMT podemos disminuir el ruido (hasta un cierto nivel).

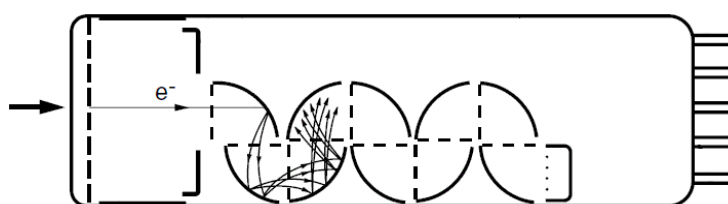


Figura 3.1.4. Diagrama del efecto avalancha en el interior de un tubo fotomultiplicador.

3.1.2.2. Detección de fotones con correlación temporal (TCSPC)

Dentro de las múltiples aplicaciones de la espectroscopía de fluorescencia [63,86-87,92] se ha desarrollado ampliamente un campo basado en la medida temporal de los eventos de fluorescencia, ya sea en el dominio del tiempo o de la frecuencia. Si a través de las medidas del estado estacionario podemos observar los cambios del entorno a partir de la variación de la intensidad o posición de las bandas de energía de emisión de fluorescencia, en el dominio del tiempo (y de manera análoga, de la frecuencia) podemos también caracterizar un medio por las interacciones con el fluoróforo en el estado excitado. Por ejemplo, la presencia de un cierto ion que provoque el quenching de un fluoróforo no solamente podrá disminuir la intensidad del espectro de emisión, sino que favorecerá la desactivación no radiativa, acortando el tiempo de vida del estado excitado.

La técnica de detección de fotones individuales con correlación temporal (más conocida por su nombre inglés: Time-Correlated Single Photon Counting) se basa en la acumulación de eventos temporales individuales para reconstruir la respuesta de un sistema en el tiempo y a partir de ahí poder obtener los tiempos de vida característicos que generaron esa respuesta ^[92]. Por tanto, esta técnica (TCSPC en lo sucesivo) requiere un sistema muy preciso de medida de tiempos en una escala muy pequeña acoplado y perfectamente sincronizado con un sistema también muy preciso de discriminación de los eventos reales.

En la práctica, los sistemas TCSPC utilizan una fuente capaz de emitir pulsos de luz con una frecuencia estable y conocida. Este pulso genera un tren de fotones que incidirá en la muestra, provocando un alto número de transiciones al estado excitado. Parte de esos procesos individuales dará lugar a la emisión fluorescente de la muestra, de la cual, a su vez, sólo una fracción será dirigida hacia un fotodetector. Para garantizar el principio de validez estadístico (un fotón excita, un fotón se detecta), el sistema debe tomar en cuenta sólo un fotón y repetir todo el proceso durante un número muy elevado de ciclos, hasta reconstruir la respuesta temporal del fluoróforo. Recuérdese, a su vez, que en una muestra no hay un único fluoróforo, sino una gran cantidad de ellos y que en cada ciclo sólo una parte llegarán a ser afectados por el tren de pulsos de excitación. No obstante, hay que señalar que en la actualidad se han desarrollado técnicas que permiten la excitación selectiva de fotones individuales.

3.1.2.3. Resolución temporal

El componente más crítico en términos de resolución temporal suele ser el detector. La precisión temporal está limitada por el tiempo que invierte el detector en la conversión de un fotón a un impulso eléctrico. Este error puede ser hasta 10 veces más pequeño que la respuesta del fotocátodo al fotón incidente. En la práctica, estos errores pueden ir desde los 20ps (FWHM) hasta los 200/400ps (FWHM) en los detectores más baratos.

La segunda fuente más importante de la ampliación de la IRF por lo general es la fuente de excitación. Aunque la mayoría de las fuentes pueden proporcionar pulsos suficientemente cortos, también es necesaria una señal de referencia sincronizada para comparar la señal debida a la fluorescencia.

Otra fuente de error de la sincronización es la incertidumbre de los componentes electrónicos utilizados para TCSPC. Esto se debe a la respuesta finita de un sistema, donde hace falta que transcurra un tiempo hasta que se alcance el nivel de señal requerido (*rise time*). Sin embargo, la contribución de la electrónica en el error total de la sincronización es relativamente pequeña. La incertidumbre típica de un sistema electrónico TCSPC suele ser de <10ps.

Es difícil especificar un límite inferior general en el curso de la vida de fluorescencia que se puede medir por un determinado instrumento TCSPC. Sin embargo, como regla general se puede suponer que pueden ser recuperados por reconvolución tiempos de vida de hasta 1/10 de la IRF (FWHM).

3.1.2.4. Fuentes de error en espectroscopía de resolución temporal

A continuación enumeramos las principales fuentes de error ^[61] que pueden aparecer a la hora de medir tiempos de vida de fluorescencia. Algunas pueden eliminarse de forma casi completa mientras que otras sólo podemos reducirlas dentro de unos límites. Muchas de ellas son tenidas en cuenta por los fabricantes de equipos, de modo que un producto comercial suele tener optimizada su eficiencia frente a sus inconvenientes. En cambio, hay otras cuya reducción dependen de la habilidad del experimentador. Al final ofrecemos un cuadro-resumen donde se indica las correcciones introducidas en este trabajo para reducir el efecto de estos errores sobre nuestras medidas.

Variaciones en el perfil de la lámpara. Este problema es especialmente frecuente en lámparas de descarga, donde el perfil de la lámpara se va modificando a medida que se van desgastando los electrodos. También otras fuentes pulsadas pueden tener un comportamiento transitorio. En diodos láser y fuentes similares, suele ser necesario esperar un tiempo después del encendido para garantizar que la intensidad y la forma del pulso están en régimen continuo y que no hay cambios apreciables. Además de un tiempo de espera razonable (sobre todo si el experimento va a ser muy largo) se recomienda fraccionar la medida en varias etapas para promediar los efectos de un posible cambio.

Interferencia electromagnética (IEM). Especialmente algunas fuentes pulsadas (lámparas de gas o fuentes láser) generan interferencias de radiofrecuencia que pueden perturbar las señales que van a ser transmitidas al hardware de control. Este efecto puede

evitarse con un aislamiento adecuado de la fuente IEM y un filtrado de las señales de entrada.

Cableado y monitorización de la señal. Cuando se ha generado un pulso en el detector, la señal tiene que sincronizarse con la etapa de control y medida, lo que implica tener que conducir el pulso generado hasta un hardware de control que procese la información. En su camino pueden emplearse cables que, por su aislamiento, defectos o impedancia, perturben la señal, introduciendo ruido o modificando su intensidad. La ventaja de los equipos comerciales completos es que han sido diseñados para eliminar estos efectos indeseables, recomendando la longitud y el tipo de cables y conexiones más adecuados.

Sincronización de la señal. En la medida de las señales de detección y referencia hay métodos de sincronización basados en la pendiente de subida y en el valor de pico. Los circuitos que efectúan los disparos (*trigger*) de inicio/fin de ciclo tienen niveles de amplitud (*trigger level*) y pendiente de subida (*rise time*) ajustables. Si se conoce cómo es la señal que viaja hacia el hardware de control, podremos optimizar estos parámetros para evitar perder información o para introducir desfases erróneos en nuestras medidas.

Problemas de acumulación de cuentas (pile-up). Si la tasa de acumulación de cuentas es muy elevada pueden añadirse cuentas de pulsos anteriores o suponerse tiempos menores de llegada, creando una falsa estadística de acumulación, lo que podría invalidar las conclusiones sobre los tiempos de vida. Por ese motivo, se recomienda que para una precisión del 99% el número de cuentas por número de eventos sea $\mu < 0,03$ [58].

Sensibilidad del detector a la longitud de onda. El fotocátodo del detector puede presentar una respuesta temporal dependiente de la longitud de onda. De hecho, la energía cinética del fotoelectrón generado es: $E_k = hc/\lambda - W_d$, donde λ es la longitud de onda del fotón detectado y W_d es el trabajo del fotocátodo para generar un fotoelectrón. Esto podría causar retardos dependientes de la longitud de onda, así como cambios en la forma del pulso de excitación. En la práctica, este problema se ha minimizado con los nuevos avances en la construcción de detectores.

Efecto posicional del detector. Del mismo modo, la sensibilidad es proporcional al área del fotocátodo que queda expuesta para ser iluminada. Este problema puede eliminarse instalando los componentes (especialmente el detector) de manera fija en el

montaje experimental, para garantizar que el área efectiva no se ve modificada en ningún momento.

Posicionamiento de la muestra. Si modificamos el camino óptico también estaremos modificando los tiempos reales de detección de los eventos. Por ejemplo, un cambio de 3cm en el camino óptico total supone un desfase de 100ps en la detección de un evento.

Impurezas en la muestra. Como es bien sabido, la fluorescencia es una técnica muy sensible, de modo que una inadecuada limpieza del material o la posible contaminación o traza de impurezas en una muestra puede añadir una contribución inesperada al decaimiento. Por ese motivo se recomienda limpiar cuidadosamente el material y no reutilizar directamente portamuestras que hayan sido empleados con otro tipo de sondas fluorescentes.

Procesos de reabsorción. En muestras muy concentradas, además de la creación de excímeros y complejos excitados, aumenta la probabilidad de reabsorción de los fotones de emisión fluorescente, debido al solapamiento de energías entre el estado fundamental y los estados excitados (sobre todo el primero). Así, por ejemplo, se ha obtenido un tiempo de vida de 6,4ns para cristales finos de antraceno, mientras que para cristales más gruesos asciende a 18ns. Por tanto, con concentraciones bajas podemos eludir este problema.

Fuente de error	Medidas para corregirlo
<i>Variaciones en el perfil de la lámpara</i>	Medir después de 30 minutos de encendido Comprobar IRF antes y después
<i>Interferencia electromagnética (IEM)</i>	Solución del fabricante (PicoQuant)
<i>Cableado y monitorización de la señal</i>	Solución del fabricante (PicoQuant)
<i>Sincronización de la señal</i>	Solución del fabricante (PicoQuant)
<i>Problemas de acumulación de cuentas</i>	En la práctica $\mu < 0,001$
<i>Sensibilidad del detector</i>	Solución del fabricante (PicoQuant/Hamamatsu)
<i>Efecto posicional del detector</i>	Todo el sistema está unido de forma fija
<i>Posicionamiento de la muestra</i>	Usar siempre el mismo portamuestras
<i>Impurezas en la muestra</i>	Lavar siempre las cubetas Marcar cubetas para condiciones similares
<i>Procesos de reabsorción</i>	Concentración $C \leq 22 \mu\text{M}$

Tabla 3.1.1. Cuadro de síntesis de las fuentes de error en espectroscopía. Contiene las medidas correctoras empleadas por el fabricante o el usuario para reducir dichos errores.

3.1.2.5. Medidas de tiempos de vida de fluorescencia

Para la medida de tiempos de vida de fluorescencia recurrimos a una solución que combina un sistema comercial desarrollado por PicoQuant GmbH con una cámara de muestras existente en el laboratorio, perteneciente a un fluorímetro de PRA International (Canadá). El esquema de funcionamiento TCSPC del fluorímetro de tiempos de vida empleado en este trabajo es el siguiente:

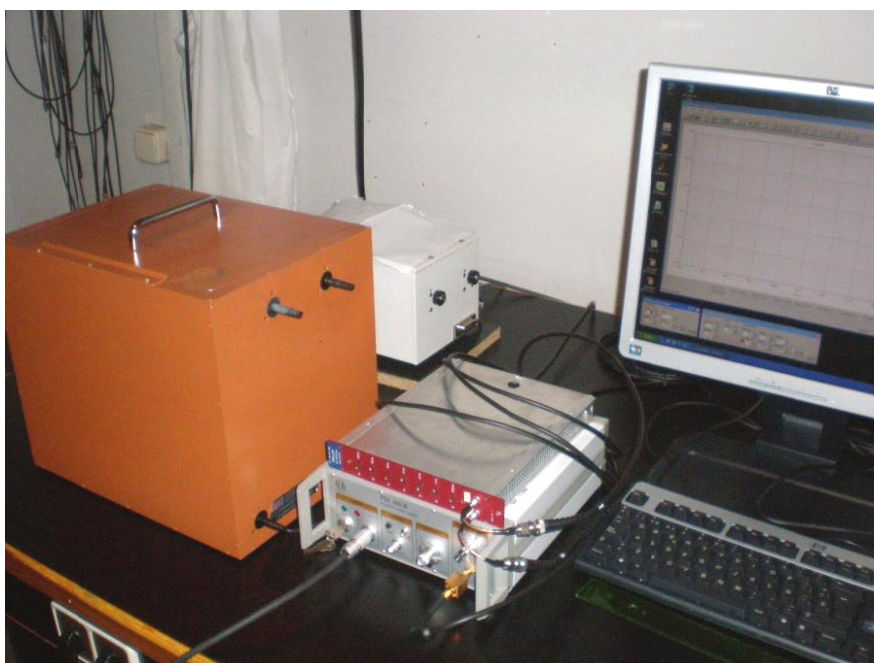


Figura 3.1.5. Montaje experimental del fluorímetro con resolución temporal

La fuente ^[76] de excitación PDL 800-B (PicoQuant GmbH) produce pulsos a distintas frecuencias (ver apartado 3.2.1.1) y tiene dos salidas: un conector multipin para la conexión con la fuente PLS ^[77] y una salida SMA (hembra) conectada al adaptador LTT100 para la señal de sincronización. Esta, a su vez, pasa por una etapa de delay ^[69] (CAEN N107, 4÷67,5 ns), que entrega la señal a la tarjeta de adquisición de datos Time Harp 200 ^[79,81].

Por otra parte, la cámara de muestras (PRA International) está acoplada a la fuente PLS y al monocromador ^[64-68] SP-150 (Acton Research/ Princeton Instruments). A la salida del monocromador se encuentra el tubo fotomultiplicador PMA-M (PicoQuant), conectado con la tarjeta de adquisición de datos Time Harp 200.

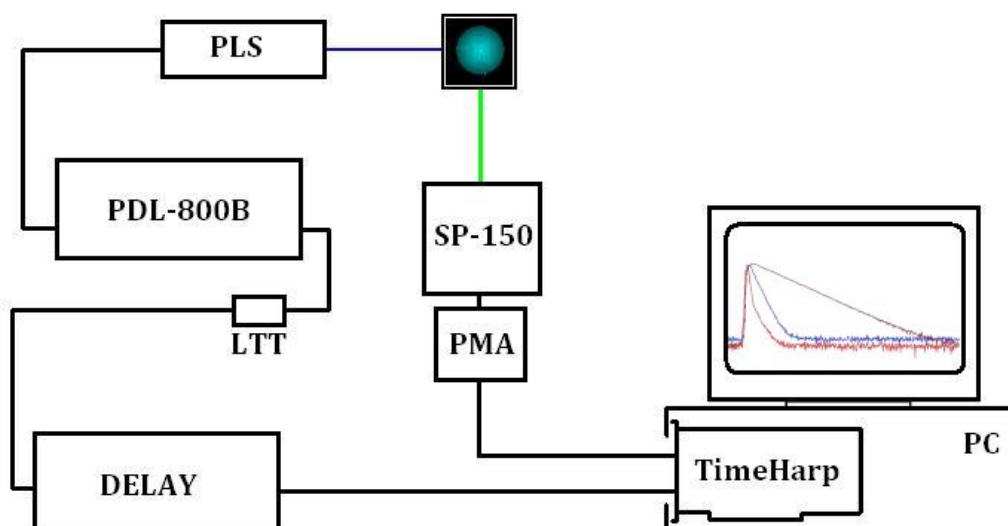


Figura 3.1.6. Esquema de funcionamiento del fluorímetro de tiempos de vida

Todos los elementos del esquema que hemos presentado responden a la configuración básica de un fluorímetro, a excepción de dos de ellos, sobre los que conviene dar una razón algo más detallada. El primero de estos elementos es el adaptador LTT100 (PicoQuant GmbH). Su función es la de transformar la salida de sincronización de la unidad PDL 800-B, diferenciándola y transformándola en un pulso corto optimizado para la electrónica de la tarjeta TimeHarp 200.

El segundo de los elementos (también reutilizado de la anterior configuración del fluorímetro de PRA International) es el delay externo de CAEN Electronics (mod. N107), cuya existencia se justifica por el modo de funcionamiento de la tarjeta de datos TimeHarp 200. Tal como hemos expuesto los principios de detección de fotones (TCSPC), cuando generamos un pulso, ponemos en marcha un contador que se detiene al recibir la señal del detector. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el tiempo de conversión que invierten los circuitos electrónicos está entre 0,3 y 2 μ s, lo que significa que a frecuencias mayores de 3MHz, el sistema se saturaría con los cálculos sin llegar a sumar las cuentas necesarias.

La solución consiste en utilizar el *modo reverso start-stop*, que mide el tiempo transcurrido entre la señal enviada por el detector y el siguiente pulso de excitación. Este sistema tiene muchas ventajas. Una de ellas tiene que ver con el tiempo de uso de los circuitos y de la memoria, ya que este método no “mide” cada pulso, sino sólo los pulsos que han dado lugar a un fotón. En el punto 3.1.2.4 hemos mencionado el efecto pile-up, que se corrige reduciendo el conteo. En la práctica, para garantizar la estadística de Poisson que caracteriza las medidas de tiempos de vida, el conteo real debe ser inferior al 5% de la frecuencia de repetición ($\mu < 0,05$). Unido al hecho de que no todos los pulsos generan un

fotón que produce un evento medible, este modo reverso mantiene ocupado el sistema de adquisición de datos durante un tiempo inferior al 5% del tiempo total.

La única posible desventaja es la necesidad de introducir un desfase en la señal que reduzca el tiempo real entre la señal de disparo del detector y la sincronización con el siguiente pulso de la fuente (que detiene la medida). Este desfase, estable y ajustable, se consigue con el delay externo N107. Tal como se muestra en la siguiente figura, en el modo directo se miden los tiempos $T1$ y $T2$ y todo un ciclo sin fotones (tiempo muerto). Sin embargo, en el modo reverso se miden los tiempos $(DELAY+T1')$ y $(DELAY+T2')$. Pero teniendo en cuenta que $\mu < 0,05$ (de hecho, $\mu < 0,001$), el modo reverso es mucho más eficiente porque no se activa en los tiempos muertos, que pueden ser más del 95% del tiempo total.

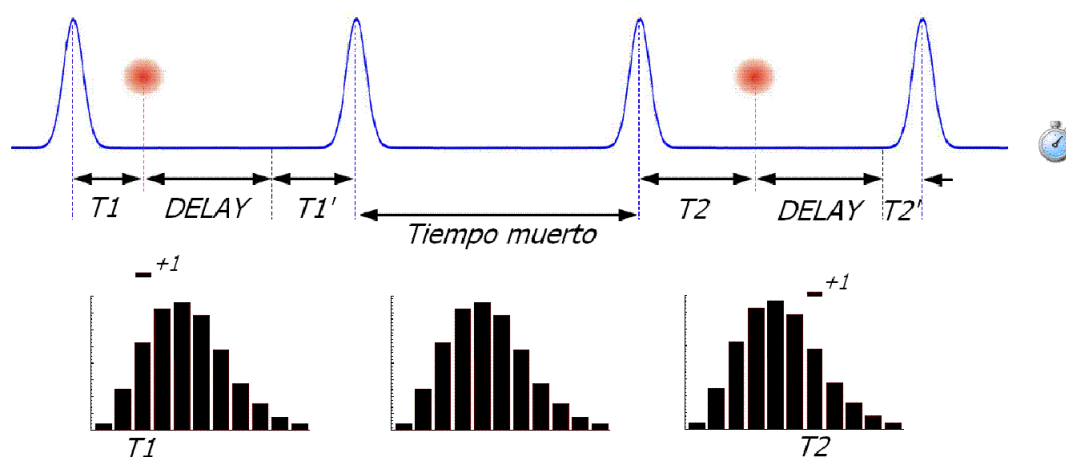


Figura 3.1.7. Diagrama del proceso de medida TCSPC en modo directo y en modo reverso.

3.1.3. Medida del pH

El valor del pH se puede medir de forma precisa mediante un potenciómetro, también conocido como pH-metro, un instrumento que mide la diferencia de potencial entre dos electrodos: un electrodo de referencia y un electrodo de vidrio que es sensible al ión hidrógeno [82-84,88-89,91].

El electrodo de referencia (generalmente de plata o cloruro de plata) es un electrodo que tiene un potencial de equilibrio estable y conocido, útil para comparar su potencial con el de otros electrodos. Habitualmente se usa una solución de llenado de

cloruro potásico muy concentrada, debido a que la velocidad de difusión de estos iones es muy similar.

Para este trabajo se empleó un pH-metro **Schott CG842**. El dispositivo permite medir valores de pH en el rango extremo ($-2 \leq \text{pH} \leq 16$) con una precisión de $\pm 0,01$ unidades de pH. Dispone de un sensor para medir simultáneamente la temperatura entre $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $55\text{ }^{\circ}\text{C}$, con una precisión de $\pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$. El equipo cuenta con un electrodo **Schott BlueLine 14pH**, dotado de un electrodo de referencia de Ag/AgCl, diafragma de platino, sensor de temperatura incorporado y emplea cloruro potásico (KCl, 3M) como electrolito de referencia.



Figura 3.1.7. Modelo de pH-metro Schott CG842

Para una determinación precisa del pH de una disolución, es necesario calibrar el aparato. Debido a la variación lineal que experimenta la diferencia de potencial medida en función del pH, los dispositivos comerciales suelen incorporar esa función de calibrado. Nuestro sistema viene equipado con una rutina de calibración de pH en dos puntos, para la cual se emplearon los tampones de referencia descritos en el tercer apartado (ver apartado 3.3.3) y cuya composición y propiedades vienen descritos en el apéndice A.4.

A la hora de medir el pH pueden aparecer algunas fuentes sistemáticas de error que es preciso tener en cuenta y minimizar durante el proceso de medida. Para ello se recomienda:

- Mantener el **electrodo** en perfecto estado. Para ello es conveniente no dejar el electrodo expuesto al ambiente por mucho tiempo (usar la tapa siempre con un poco de agua) y asegurarse de que el nivel de electrolito (KCl, 3M) está al máximo.
- Usar sólo como **patrones de calibración** las disoluciones tampón que hayan sido preservadas de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (almacenamiento, tiempo de uso,...).
- Medir siempre en las mismas **condiciones**, asegurando que la posición del electrodo y el volumen en que se sumerge son adecuados para obtener valores fiables.
- Realizar **varias medidas** de pH y temperatura. El valor de pH varía con la temperatura y si se realiza la medida de un sistema que no se ha estabilizado, las lecturas pueden variar con el tiempo, dando lugar a errores que son difíciles de cuantificar.

En el apéndice A.5 se ha incluido un apartado donde se determina de forma experimental la precisión de las medidas de pH realizadas en este trabajo.

3.1.4. Diseño de elementos para la configuración del fluorímetro

Para poder adaptar los nuevos elementos con la cámara de muestras se diseñó un sistema de fijación para el acoplamiento de la fuente PLS y otro para el acoplamiento con el monocromador. La cámara de muestras (PRA International) tiene las dimensiones de acuerdo con el Sistema Anglosajón (dado en pulgadas). Sin embargo, las modificaciones no han alterado sus dimensiones o el camino óptico.

Para **acoplar la fuente PLS a la cámara de muestras** se utilizó el tubo de salida de la lámpara estacionaria del antiguo fluorímetro PRA. En el interior del tubo se colocó un cilindro hueco (en cuyo interior puede encajarse la fuente PLS) rodeado por una junta tórica, que permite que el conjunto (cilindro+PLS) deslice alineado con el eje del tubo. Esto permite desplazar ligeramente la fuente PLS, en caso de que la señal sea demasiado intensa.



Figura 3.1.8. Acoplamiento de la fuente PLS a la cámara de muestras

Para **acoplar la cámara de muestras con el monocromador**, se diseñó una pieza mecanizada en aluminio que queda atornillada a la entrada del monocromador y que aloja perfectamente la salida de la cámara de muestras, manteniendo la óptica del sistema.

En tercer lugar, para proteger el detector de la luz directa, se colocó un **interlock de seguridad** que cierra una ventana interna del detector cuando la cámara de muestras está abierta (un interruptor fin de carrera normalmente abierto, junto al borde exterior, conectado a una salida de *interlock* del tubo fotomultiplicador).

Finalmente, se diseñó una cubeta de metacrilato para la **medida de muestras sólidas**, adaptada para la excitación a 45° de los hidrogeles. Debido a que las muestras sólidas dispersan una mayor cantidad de luz, es más difícil obtener una señal cuando se excita la muestra frontalmente y se mide la emisión a 90° . En su lugar, buscamos la forma de aumentar la señal, colocando las caras paralelas del gel a 45° con respecto al ángulo de excitación frontal. De esta manera, la cantidad de luz que recibe el detector es mayor, aunque no es la solución óptima. Téngase en cuenta que se introduce una interfase metacrilato-aire-hidrogel; además de la propia traslucidez de las muestras. La ventaja de este diseño es que utiliza el mismo portamuestras y la misma configuración que las medidas en disolución.

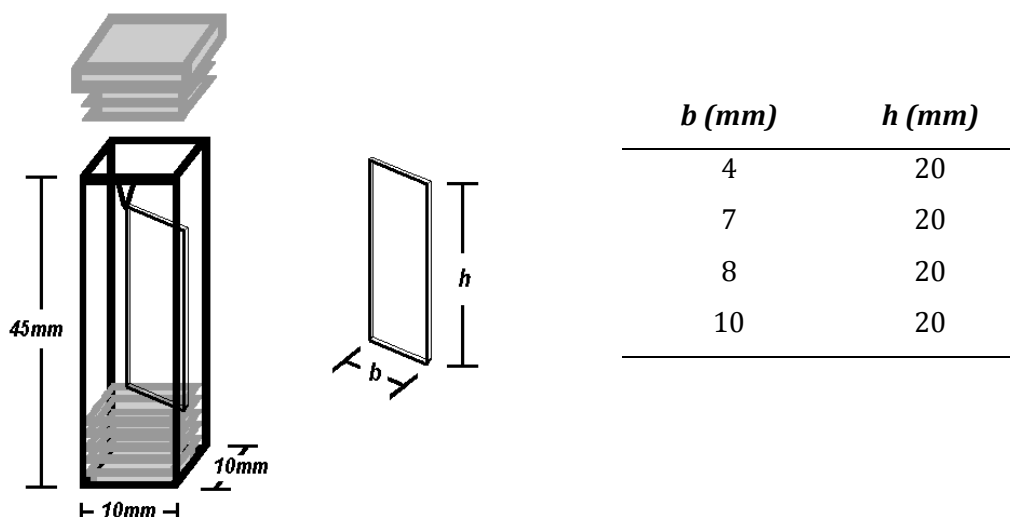


Figura 3.1.9. Diseño de la cubeta de metacrilato para la medida de tiempos de vida de fluorescencia en hidrogeles.

3.1.5. Otros dispositivos experimentales

En la caracterización de las fuentes de excitación se utilizó el osciloscopio Hameg HM303-3 (Hameg Instruments GmbH) [72]. Su base de tiempos (0,2 s/cm – 100 ns/cm) puede expandirse hasta 10 ns/cm para las frecuencias más pequeñas. La señal de disparo puede llegar hasta 50MHz, con amplificadores de entrada de bajo ruido. Todos los cables de conexión con el osciloscopio y de interconexión del fluorímetro son cables coaxiales (50Ω), protegidos y apantallados, con conectores BNC compatibles.

Para las pesadas más grandes se utilizó la balanza de precisión Gibertini EU1200 ($\Delta m = \pm 0,1g$) y para pesos más pequeños se emplearon la balanza analítica Sartorius Basic ($\Delta m = \pm 0,1mg$) y la ultramicrobalanza Perkin-Elmer AD-4 Autobalance ($\Delta m = \pm 6\mu g @ 20mg$). En todas las balanzas se comprobó la calibración en uso. A la hora de utilizar la balanza analítica, se utilizaron trozos de papel de aluminio para evitar la contaminación de las muestras con posibles residuos depositados en el plato de balanza.

3.2. Metodología experimental

A partir del fundamento teórico descrito en el capítulo segundo y habiendo explicado el principio de funcionamiento de la instrumentación utilizada en este trabajo,

esta sección quiere servir como referencia de las condiciones experimentales elegidas, así como para presentar algunos cálculos adicionales que se emplearon para caracterizar las muestras y complementar las medidas.

Así, por ejemplo, se indican los parámetros de ajuste en la obtención de espectros de absorción, fluorescencia y en los decaimientos; se indican algunos métodos gráficos con los que posteriormente construir curvas de calibración en función del pH y se derivan las fórmulas que permiten calcular el rendimiento cuántico, la concentración óptima de cromóforo en una valoración espectrofotométrica y los parámetros relacionados con el grado de hinchamiento de un hidrogel en el equilibrio.

3.2.1. Caracterización optoelectrónica de las fuentes de excitación

El objetivo a la hora de caracterizar mejor las fuentes de excitación es la obtención de valores óptimos para los parámetros ajustables en la medida de tiempos de vida de fluorescencia. Con estos resultados podremos confeccionar unas tablas que orienten al experimentador a la hora de manejar el equipo y ajustar las condiciones óptimas para el tipo de muestras que desee caracterizar. Por esta razón, los resultados experimentales de este apartado se presentan también en el Apéndice A.2 como parte del manual de uso rápido del equipo de medida de tiempos de vida.

3.2.1.1. Monitorización de la señal de disparo de los pulsos de excitación

La fuente generadora de pulsos para diodos láser y LED (PDL-800-B, PicoQuant GmbH) tiene un oscilador interno a una frecuencia característica de 40MHz, unido a una etapa de divisores de frecuencia $\frac{1}{2}$, tal que podemos obtener submúltiplos de la frecuencia característica f_0 .

$$f = f_0 \left(\frac{1}{2}\right)^N ; \quad N = \{0, 1, 2, 3, 4\} \quad [3.1]$$

El generador PDL-800-B puede generar pulsos de 40MHz, 20MHz, 10 MHz, 5 MHz y 2,5 MHz. El selector de frecuencias del equipo indica el factor de división: 1, 2, 4, 8 y 16, respectivamente. La forma del pulso generado, la potencia óptica y las características del

diodo darán lugar a un pulso de excitación en el dominio de tiempos de vida (*IRF*, *instrument response function*) que es útil conocer para ajustar los parámetros de del software.

3.2.1.2. Optimización por software de los parámetros de la señal

Ya hemos descrito las características de la señal a la salida del generador PDL-800-B. Ahora indicaremos alguna característica relacionada con la sincronización de la señal en la tarjeta de adquisición de datos TimeHarp 200. Cabe destacar dos propiedades: la resolución de la escala de tiempos y el delay adicional.

La **resolución de la escala de tiempos** también es un parámetro que depende de la frecuencia de pulsación, ya que la asignación de canales a los bloques internos de memoria de la tarjeta depende de la escala de tiempos considerada. Así, para garantizar una correcta representación, la ventana de tiempos que utiliza el software se corresponde con el período de la señal, esto es, igual a la inversa de la frecuencia de repetición $\Delta T = 1/f$. Por otra parte, como la ventana de tiempos puede aumentar o disminuir hasta en 16 veces, el uso de los bloques de memoria no permite la misma resolución para todas las frecuencias. Cada bloque de memoria tiene un número fijo de 4096 canales para el histograma. De modo que la resolución (R) multiplicada por el número de canales nos da la ventana de tiempos disponibles: $\Omega = 4096 \cdot R$. Como la ventana de tiempos debe ser mayor que el período de pulsación de la fuente ($\Omega > \Delta T$), entonces el límite de la resolución viene dado por: $R > \Delta T / 4096$. El objetivo de nuestras medidas es encontrar la máxima resolución posible para cada frecuencia, acompañada de los parámetros del software que el experimentador necesita ajustar.

El **delay adicional** se ha introducido mediante un delay externo (C.A.E.N. Electronics) que añade un retraso a la señal para su óptima representación en el histograma de tiempos. De esta forma, podemos acumular los pulsos significativos dentro de la ventana disponible del histograma de tiempos. Definimos el **delay óptimo**, δ_{opt} , como el retraso introducido por el módulo externo de forma que el pulso de excitación se registra a partir del 5% inicial de los canales del histograma. De esta forma, nos aseguramos que registramos el pulso completo sin perder demasiados canales para registrar el decaimiento de una muestra.

3.2.1.3. Variación de la intensidad con la frecuencia de pulsación

Cada una de las frecuencias disponibles en el PDL-800-B genera trenes de pulsos con una potencia característica. Esto se traduce en una mayor o menor intensidad luminosa y en cambios de la forma del pulso. En la medida de tiempos de vida resulta particularmente útil poder estimar el conteo que tendrá nuestro decaimiento cuando excitamos una muestra con una determinada fuente y a una frecuencia dada.

Asumiendo que cada muestra tiene una absorción y emisión características, no es posible obtener una medida que tenga validez universal, si bien una medida de referencia resulta orientativa en la práctica. Dado que la mayoría de las muestras medidas en este trabajo son de sondas fluorescentes en disoluciones acuosas, elegimos como medida de referencia una muestra dispersiva a partir de una suspensión coloidal de LUDOX (1:2 en agua).

En las tablas que se muestran bajo estas líneas están los resultados obtenidos para las dos fuentes LED de excitación disponibles. El método experimental ha sido el siguiente:

- 1) Ajustar a 2,5 mm la apertura de las rendijas colimadoras de entrada y salida del monocromador (la máxima apertura es de 3mm).
- 2) Ajustar la intensidad de la fuente con el potenciómetro hasta el valor deseado (escala porcentual con precisión analógica de 0,1%).
- 3) Obtener de forma continua el perfil de excitación de la fuente con el software TimeHarp 200, seleccionando una longitud de onda donde la señal sea la más alta posible.
- 4) Una vez estabilizada la intensidad, anotar el valor promedio del conteo durante un minuto.
- 5) Repetir este procedimiento para cada frecuencia, seleccionando varios valores de intensidad para cada frecuencia.

3.2.1.4. Medida del ancho espectral y ancho de pulso

La caracterización optoelectrónica de las fuentes concluye con este apartado, que determina la efectividad de las medidas con resolución temporal como técnica de caracterización. Por una parte, el ***ancho espectral***, que nos permite buscar una excitación

más eficiente; por otra parte, el **ancho del pulso**, que nos da una idea de la máxima resolución en el cálculo de tiempos de vida por métodos de reconvolución.

Definimos el **ancho espectral**, Δ , como el *intervalo de longitudes de ondas en el que la intensidad de una fuente de excitación es superior al 50% del valor máximo de intensidad*, denominado en inglés *full width at half maximum* (FWHM). En la práctica, se ha obtenido este ancho de banda espectral a través de las intensidades de los decaimientos de la fuente (IRF, *instrument response function*, en inglés) a diferentes longitudes de onda. El acondicionamiento del espectro se ha realizado utilizando los filtros Savitzky-Golay, tal como se indica en el Apéndice A.7 de este trabajo.

Definimos el **ancho de pulso**, δ_{IRF} , como el *intervalo de tiempo en el que la intensidad del pulso de excitación (IRF) es superior al 50% del valor máximo de intensidad*. Como regla práctica en Espectroscopía [58], se relaciona esta magnitud con la resolución en el cálculo de tiempos de vida, estableciendo que *el menor tiempo de vida real que puede recuperarse a partir de la deconvolución de un decaimiento es aproximadamente la décima parte del ancho del pulso* ($\tau_{\text{MIN}} \approx \delta_{\text{IRF}}/10$).

3.2.2. Caracterización fotofísica de sondas fluorescentes

Las propiedades fluorescentes de una sustancia resultan de gran interés a la hora de emplearlas en numerosas aplicaciones, por la gran cantidad de información que nos pueden proporcionar. Aunque en este trabajo son especialmente importantes las medidas de tiempos de vida, es necesario, sin embargo, determinar otras propiedades que nos garanticen un uso correcto de la sonda elegida para nuestros propósitos.

3.2.2.1. Medida de los espectros de absorción

En nuestro trabajo hemos elegido una sonda fluorescente sensible al pH, que experimenta cambios tanto en su espectro de absorción como en su espectro de emisión. Eso significa que su respuesta será distinta a diferentes valores de pH. Como la fuente de excitación tiene un intervalo fijo de longitudes de onda de emisión, el desplazamiento de las bandas de absorción lejos del ancho espectral de la lámpara hace que disminuya la intensidad de la emisión.

Por otra parte, cuando los hidrogeles son sumergidos en una disolución que contiene una cierta cantidad de sonda fluorescente, parte de la sonda estará confinada en el interior del gel o inmovilizada en su superficie, lo que puede modificar la concentración total de la sonda en el sobrenadante. Por este motivo, los espectros de absorción nos permiten cuantificar los cambios debidos al pH de la disolución y observar cambios en la concentración de la sonda.

Los espectros de absorción se obtuvieron con el espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 14P, cuyos principios de funcionamiento fueron descritos en el apartado 3.1.1. Todos los espectros fueron medidos en el rango 350nm-650nm con un paso de 0,5nm (slit 1nm). La velocidad de escaneo fue de 120nm/min. Los valores fueron obtenidos en unidades de absorbancia, sin aplicar factores de escala y con una corrección automática de línea de base con la ayuda de un blanco (muestra de referencia del disolvente puro). Todas las muestras se midieron utilizando cubetas de metacrilato de un paso óptico de $l=1\text{cm}$.

Las medidas de absorción combinadas con la valoración ácido-base están descritas con más detalle en el apartado 3.2.4 y en el apéndice A.3.

3.2.2.2. Medida de los espectros de emisión de fluorescencia

Partiendo de la explicación dada para las medidas de absorción, también los espectros de emisión se utilizaron para cuantificar los cambios debidos al pH, así como para el cálculo del rendimiento cuántico de la sonda fluorescente.

Las medidas estacionarias de fluorescencia se obtuvieron con el fluorímetro Edinburgh 900CDT, cuyos principios de funcionamiento se detallaron en el apartado 3.1.2. Todos los espectros fueron medidos en el rango 500nm-800nm con un paso de 0,5nm (slits 1mm). Cada espectro fue obtenido como la suma de 4 barridos con un tiempo de medida de 0,3s/paso (velocidad de escaneo de 100nm/min). La longitud de onda elegida para la excitación fue $\lambda=486\text{nm}$. El conteo promedio de los espectros fue próximo a 15000cps. Para las medidas estacionarias también se utilizaron cubetas de metacrilato de un paso óptico de $l=1\text{cm}$.

3.2.2.3. Medida del rendimiento cuántico

Aunque en el capítulo dedicado al fundamento teórico habíamos dado una definición del rendimiento cuántico, es preciso añadir algunas consideraciones al respecto, ya que no existe una forma directa de determinar la contribución de cada uno de los mecanismos de relajación que intervienen en las moléculas fluorescentes. La forma más habitual de medir el rendimiento cuántico de un fluoróforo es por comparación con un estándar de referencia, cuyo rendimiento cuántico es perfectamente conocido. Los cálculos se efectúan a partir de:

$$\Phi = \Phi_{REF} \frac{I}{I_{REF}} \frac{A_{REF}}{A} \left(\frac{n}{n_{REF}} \right)^2 \quad [3.2]$$

Por su propia definición, sabemos que el rendimiento cuántico será proporcional al cociente entre la absorbancia a una longitud de onda (A) y la intensidad total del espectro de fluorescencia (I). J. N. Demas y G. A. Crosby ^[61] introducen la corrección con el índice de refracción, donde la potencia cuadrada está relacionada con la Ley de Snell. Reescribimos la fórmula anterior en función del coeficiente de extinción molar y de la concentración:

$$\Phi = \Phi_{REF} \frac{I}{I_{REF}} \frac{\varepsilon_{REF} C_{REF}}{\varepsilon C} \left(\frac{n}{n_{REF}} \right)^2 \quad [3.3]$$

Si utilizamos el mismo disolvente (en iguales condiciones de temperatura), excitamos ambas sustancias a la misma longitud de onda y utilizamos también las mismas concentraciones, obtenemos una expresión más sencilla:

$$\Phi = \Phi_{REF} \frac{I \cdot \varepsilon_{REF}}{I_{REF} \cdot \varepsilon} \quad [3.4]$$

Los valores del coeficiente de extinción molar se pueden obtener a partir de la literatura (valores directos o con ayuda de medidas de absorción), así como el valor del rendimiento cuántico del estándar de referencia. Finalmente, bastaría con medir los espectros de emisión en las mismas condiciones: temperatura, disolvente, concentración y longitud de onda de excitación. La única comprobación necesaria para validar este cálculo

es comprobar que el valor de la absorbancia es lo suficientemente bajo ($A < 0,05$) como para evitar efectos de reabsorción (*inner filter effect*).

3.2.2.4. Medida de tiempos de vida por métodos de deconvolución

Para la medida de tiempos de vida se utilizó el fluorímetro compuesto por una fuente LED pulsada por la unidad PDL-800B (PicoQuant GmbH), con una longitud de onda central de excitación de 486nm (ver el apartado 4.1 de resultados para una completa caracterización de la fuente). La pulsación de la excitación se realizó a 10MHz y 20MHz (en cada caso se indica la frecuencia). Las rendijas de colimación del monocromador se abrieron a 2,5mm y 3mm (según el caso) para facilitar conteos comprendidos entre 1.000cps y 10.000cps. Para las medidas en disolución se utilizaron las mismas cubetas de metacrilato que para las medidas de absorción y fluorescencia.

3.2.3. Curvas de calibrado en función del pH

Los cambios fotofísicos de una sonda fluorescente sensible al pH serán detectables en alguno o en todos sus espectros característicos. Hay sondas ^[49,51] cuya emisión es sensible al pH, mientras que sus espectros de absorción sufren una variación poco significativa. Otras sondas, experimentan cambios tanto en sus espectros de absorción como en sus espectros de emisión.

3.2.3.1. Método ratiométrico

Una forma ampliamente extendida de utilizar estos cambios para determinar el pH de una muestra que contiene una sonda fluorescente sensible al pH es mediante el llamado método ratiométrico ^[47,53], que consiste en utilizar los cocientes de las intensidades (medidas en valores absolutos o relativos) del espectro en dos longitudes de onda características.

Sean I_{11} , I_{12} , I_{13} , las intensidades del espectro de una sonda sensible al pH para las longitudes de onda λ_1 , λ_2 y λ_3 , con un $\text{pH} = \text{pH}_1$. Podemos definir las razones $R_{11} = I_{11}/I_{12}$ y $R_{12} = I_{13}/I_{12}$. Del mismo modo, cuando el valor de $\text{pH} = \text{pH}_2$, las intensidades del espectro de

la sonda para las mismas longitudes de onda serán ahora: I_{21} , I_{22} , I_{23} . Ahora podremos definir las razones entre estas intensidades como: $R_{21}=I_{21}/I_{22}$ y $R_{22}=I_{23}/I_{22}$.

En la gráfica F.322-1 aparece simulado el comportamiento de una sonda sensible al pH, donde para dos valores de pH distintos, los máximos de emisión cambian, cambiando sus intensidades relativas pero sin sufrir desplazamientos en las longitudes de onda. En este caso, sería útil emplear las razones antes empleadas.

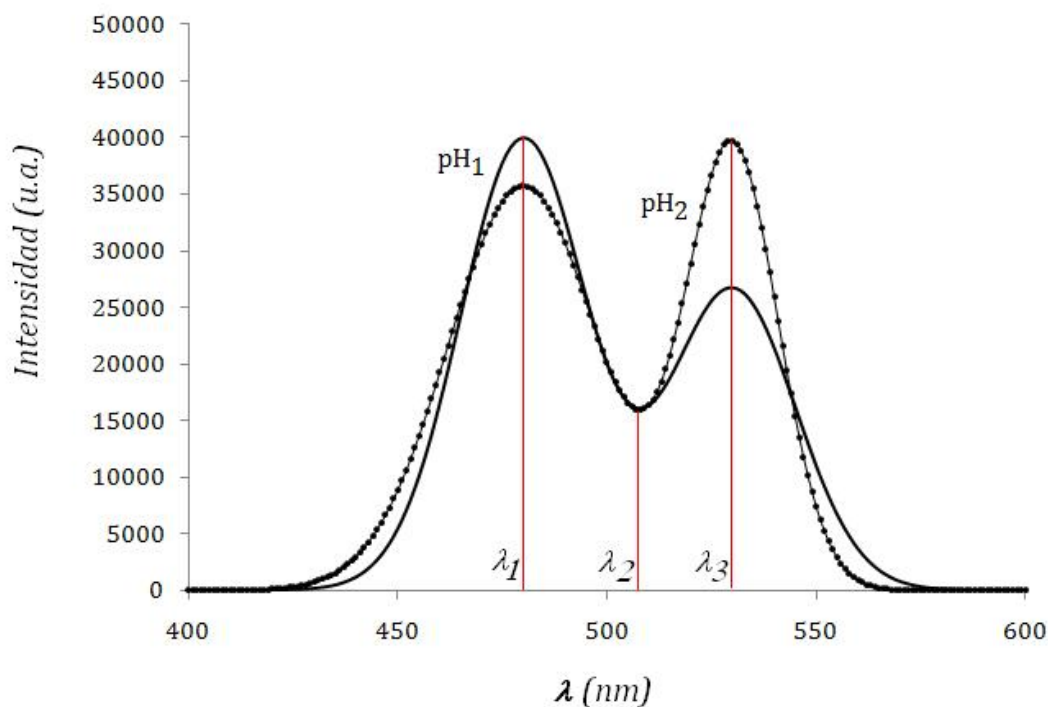


Figura 3.2.1. Cambios en el espectro de emisión de una sonda sensible al pH

Podemos construir una tabla con los valores de intensidad según el gráfico:

<i>Longitud de onda (λ)</i>	<i>I_{pH1} (u.a.)</i>	<i>I_{pH2} (u.a.)</i>
480 nm	40.000	35.740
510 nm	16.350	16.350
530 nm	26.750	39.750

Tabla 3.2.1. Valores numéricos de intensidad tomados de la figura 3.2.1

Si tenemos en cuenta que a 510nm aparece un punto isobástico, conviene definir las razones de intensidades como $R_{480/510}$ y $R_{530/510}$. Así, obtenemos:

	$R_{480/510}$	$R_{530/510}$
pH1	2,4465	1,6361
pH2	2,1859	2,4312

Tabla 3.2.2. Valores ratiométricos de intensidad en función del pH

Estos cocientes adimensionales de intensidades serán característicos de la sonda para cada valor de pH. Si se obtienen las intensidades de los espectros para diferentes valores de pH, podremos construir una gráfica para cada cociente $R_{480/510}$ y $R_{530/510}$. A partir de esta gráfica podemos construir una curva de calibrado R_i -pH para cada uno de los cocientes. Esta curva nos permitirá determinar el pH a partir de los valores de los cocientes R_i de una muestra cuyo pH sea desconocido. Cabe señalar que este método ratiométrico es aplicable tanto a los espectros de absorción como a los espectros de emisión de una sonda.

3.2.3.2. Calibración basada en tiempos de vida de fluorescencia

Mientras que cualquier sonda sensible al pH experimentará cambios en su absorción o en su emisión (o en ambas, simultáneamente), solamente en algunas sondas podremos observar además un cambio en sus tiempos de vida y parámetros de estado excitado. Esta propiedad puede resultar de gran interés en aplicaciones biológicas, especialmente en microscopía de tiempos de vida de fluorescencia (FLIM).

En este trabajo, el interés no se centra en la excitación individual de moléculas, útil en microscopía de fluorescencia, sino en los tiempos de vida de un volumen (ingl. *bulk*) relativamente grande. Tomando como punto de partida el ciclo de Förster [6], supongamos que una determinada sonda sensible al pH experimenta también cambios en sus tiempos de vida debido a la presencia de reacciones de transferencia de carga en el estado excitado.

Si observamos un único tiempo de vida que varía con el pH, podemos construir una gráfica en la que representemos el tiempo de vida frente al pH de cada muestra. Entonces, dentro del rango de pH útil de la sonda habrá una curva que ajuste los datos que nos permita calcular el pH para un tiempo de vida τ_m medido: $\tau=f(\text{pH}) / \tau_m \rightarrow \text{pH}_m$.

Si el mecanismo de dependencia del tiempo de vida con el pH se puede explicar de acuerdo con las ecuaciones propuestas en el ciclo de Förster, aparecerían dos tiempos de

vida y podríamos calcular las constantes de equilibrio asociadas, pudiendo determinar el pH de una muestra a partir de las contribuciones de los tiempos de vida y de los parámetros calculados.

Un tercer método, similar al primero, consiste en calcular los promedios de los tiempos de vida, ajustando así mediante una curva los tiempos medios calculados con el pH de las muestras. Nuevamente tendremos una función que relacione los promedios calculados de los tiempos de vida medidos con el pH desconocido de una muestra.

3.2.4. Valoraciones espectrofotométricas

En el segundo capítulo ya hemos dedicado un apartado a explicar en qué consiste una valoración ácido-base. Ahora nos detendremos a estudiar cómo podemos utilizar este procedimiento para obtener una medida del pK_a de las sondas fluorescentes.

Numerosas sustancias químicas son empleadas con frecuencia como indicadores ácido-base. A veces es suficiente con observar el viraje de estas sondas de un color a otro, de manera orientativa, ya que normalmente disponemos de elementos que miden el pH con mayor precisión. Sin embargo, a nosotros nos interesa conocer con precisión cuándo una sonda fluorescente sufre cambios en su estructura y propiedades por efecto del pH, ya que pequeñas variaciones en el pH podrían suponer cambios dramáticos en las propiedades fotofísicas que empleamos para caracterizar otros sistemas. Por tanto, conviene caracterizar estos cambios.

Las sondas fluorescentes sensibles al pH modifican su comportamiento en el estado excitado a medida que el equilibrio de transferencia de carga se ve más favorecido en un sentido u otro de la reacción. Estos cambios pueden servirnos para determinar cuál es el pH de equilibrio, esto es, el pK_a . Sin embargo, estos cambios no se producen para cualquier pH. Existe un límite más allá del cual la sonda no nos podrá proporcionar información sobre el medio, porque el equilibrio está desplazado casi totalmente en un sentido o en otro. Para la mayoría de los indicadores químicos, este límite suele ser 1,5 unidades de pH. En general, un indicador químico de pH es útil en el rango $pK_a \pm 1,5$.

Por tanto, resulta imprescindible conocer el pK_a de una sonda fluorescente si queremos usarla como sensor químico de pH, ya que el pK_a determinará el rango de valores de pH en el que podremos usar esta sonda como sensor. Una forma de caracterizar

este rango es obteniendo sus espectros de absorción y emisión para una serie discreta de valores de pH. Para ello debemos preparar tantas muestras como valores de pH queramos utilizar.

Este método es útil cuando se quieren utilizar las propiedades espectrales de una sonda para caracterizar un sistema, pero cuando el objetivo es determinar el pK_a , es necesario recurrir a otros métodos. Una buena alternativa consiste en realizar una valoración espectrofotométrica. Este método consiste en realizar la valoración de un ácido al que se ha añadido una cierta cantidad de cromóforo, de modo que tras cada volumen de base que añadimos medimos la absorbancia de la disolución. Posteriormente habrá que corregir los valores de absorbancia con la concentración, ya que la sonda va quedando cada vez más diluida:

$$A_{corregida} = A_{medida} \frac{(V_{inicial} + V_{valorante})}{V_{inicial}} \quad [3.5]$$

Consideremos un cromóforo sensible al pH en el sentido que hemos enunciado anteriormente. A una determinada longitud de onda y para un pH muy ácido, la absorbancia será la de la forma ácida: $A_a = C \cdot \epsilon_a \cdot l$. Para un pH muy básico, la absorbancia será la de la forma totalmente deprotonada de la sonda: $A_b = C \cdot \epsilon_b \cdot l$. Si en lugar de considerar los extremos, particularizamos ahora para un pH intermedio, tendremos que: $A = C_a \cdot \epsilon_a \cdot l + C_b \cdot \epsilon_b \cdot l$. Sustituyendo los coeficientes de absorción molar en esta ecuación:

$$A = C_a \frac{A_a}{C} + C_b \frac{A_b}{C} \quad [3.6]$$

$$C \cdot A = C_a A_a + C_b A_b \quad [3.7]$$

Como la suma de las concentraciones de ambas especies debe ser igual a la concentración inicial de la sonda: $C = C_a + C_b$, podemos reescribir la expresión anterior como:

$$C_a A + C_b A = C_a A_a + C_b A_b \quad [3.8]$$

Reagrupando los términos por factores comunes y expresando el resultado en forma de cociente:

$$\frac{C_b}{C_a} = \frac{A - A_a}{A_b - A} \quad [3.9]$$

Introduciendo este cociente en la ecuación de Henderson-Hasselbach, que relaciona el pH con el pK_a y la concentración de las especies ácida y básica, resultará:

$$pH = pK_a + \log_{10} \left(\frac{A - A_a}{A_b - A} \right) \quad [3.10]$$

De manera análoga, podemos hacer lo mismo para encontrar una relación con los coeficientes de absorción molar:

$$pH = pK_a + \log_{10} \left(\frac{\varepsilon - \varepsilon_a}{\varepsilon_b - \varepsilon} \right) \quad [3.11]$$

De esta forma, conocidas las absorbancias o los coeficientes de extinción molar para valores extremos de pH (a una determinada longitud de onda), donde ya no hay cambios, pueden medirse las absorbancias para valores intermedios de pH (a la misma longitud de onda) y obtener a partir de esos datos una estimación del pK_a del cromóforo. Esa estimación se consigue recurriendo a un modelo de regresión lineal, donde el pH será la variable dependiente y tomaremos $\log_{10} \left(\frac{\varepsilon - \varepsilon_a}{\varepsilon_b - \varepsilon} \right)$ como variable independiente. La ordenada en el origen será la estimación de pK_a y el valor de la pendiente ($m \sim 1$) nos servirá para el contraste de hipótesis que valide el ajuste experimental. En el punto de pK_a , Lindqvist ^[54] supone que el coeficiente de extinción molar será el promedio de los coeficientes de la forma protonada y deprotonada: $\varepsilon = (\varepsilon_a + \varepsilon_b)/2$. Por consiguiente, en el punto de pK_a el valor de la expresión logarítmica se hace cero y podemos determinar gráficamente este punto como el valor de pH en el que la recta de regresión lineal que ajusta los datos ($y = mx + n$) corta al eje de abscisas ($pK_a = -n/m$).

3.2.5. Cálculo de la concentración óptima de cromóforo

A la hora de realizar estas valoraciones espectrofotométricas, puede surgir la duda de cuál es la concentración más adecuada de cromóforo. Por una parte, durante la valoración vamos diluyendo su concentración; por otra, en cambio, puede suceder que haya un cambio brusco en el coeficiente de extinción molar al pasar de la forma ácida a la forma básica. Eso significa que la absorbancia puede alcanzar valores muy altos o caer hasta un límite en que perdemos resolución.

Para preparar una disolución inicial con una concentración óptima de cromóforo es necesario conocer tener conocimientos previos acerca de la curva ácido-base y de las propiedades fotofísicas de las dos especies.

En nuestro caso, en una valoración HCl–NaOH, el cromóforo X tendrá un número p de formas prototrópicas. Por tanto, con la adición progresiva de volúmenes de NaOH en la disolución ácida, podríamos llegar a observar las $p-1$ variaciones espectrales debidas a cada uno de los equilibrios de las formas protonadas/deprotonadas. Cada una de las formas X_i del cromóforo tiene una longitud de onda λ_i^M para la que su absorción es máxima en todo el rango de pH. Siendo A_i el valor máximo de absorbancia de la forma X_i para una longitud de onda λ_i^M , tomaremos $A_M = \max \{A_1, A_2, \dots, A_p\}$, máximo absoluto de los máximos de absorbancia de todas las especies, como valor de referencia para nuestros cálculos.

Manteniendo una concentración de cromóforo adecuada, seguirá siendo válida la solución particular $A = \epsilon \cdot C \cdot l$ (ley de Beer-Lambert). De este modo, si disolvemos un volumen V_S de una disolución de cromóforo, con una concentración C_s , en un volumen V_H de ácido clorhídrico, la concentración de cromóforo, C_0 , antes de la valoración será:

$$C_0 = C_s \frac{V_S}{V_S + V_H} \quad [3.12]$$

Cuando hayamos añadido un volumen V_N de hidróxido sódico tal que el pH de la muestra haya alcanzado el valor para el que la absorbancia del cromóforo es un máximo absoluto, A_M , entonces la concentración de cromóforo será:

$$C = C_s \frac{V_S}{V_S + V_H + V_N} \quad [3.13]$$

Aplicando la ecuación de Beer-Lambert tendremos que:

$$A_M = \varepsilon_M C l = \varepsilon_M C_s \frac{V_S}{V_S + V_H + V_N} l \quad [3.14]$$

Despejando la concentración:

$$C_s = \frac{A_M}{\varepsilon_M l} \left(1 + \frac{V_H + V_N}{V_S} \right) \quad [3.15]$$

Por una parte, nos interesa que la absorbancia sea lo mayor posible para poder operar en un amplio rango que nos permita una buena resolución. Pero por otra parte hay que evitar la formación de excímeros y complejos, así como posibles desviaciones de la ley de Beer-Lambert, o de lo contrario nuestras medidas dejarán de ser significativas. Por tanto, definiremos la concentración óptima de cromóforo como el máximo valor de absorbancia para el que la desviación de la ley de Beer-Lambert es inferior al 5%. Dicho de otra forma, $A_M \leq A_{lim}$, siendo A_{lim} el valor límite de absorbancia que presenta una desviación máxima del 5% de la linealidad.

$$C_s \leq \frac{A_{lim}}{\varepsilon_M l} \left(1 + \frac{V_H + V_N}{V_S} \right) \quad [3.16]$$

Ahora podemos hacer una aproximación que nos simplifique el cálculo. Si empleamos un ácido (HCl) y una base (NaOH) de la misma concentración y el límite de absorbancia aparece cerca de pH=7, tendremos que $V_H \approx V_N$, resultando entonces:

$$C_s \lesssim \frac{A_{lim}}{\varepsilon_M l} \left(1 + 2 \frac{V_H}{V_S} \right) \quad [3.17]$$

Esta expresión sólo tiene en cuenta como variables externas el coeficiente de extinción molar de la sonda y el factor de dilución de la disolución madre en el medio ácido, expresado como el cociente V_H/V_S . El límite de absorbancia vendrá dado por las características del espectrofotómetro y sus accesorios.

Cuando la concentración de cromóforo es suficientemente pequeña, las limitaciones que encontramos son de origen instrumental. Si las células están limpias y correctamente alineadas y el sistema monocromador tiene una buena selectividad de longitudes de onda, las desviaciones se deben a la contribución de luz externa o parásita (*stray light*) [85,90].

En general, cuando la transmitancia de una muestra es baja o muy baja (valores altos de absorbancia), el efecto *stray light* se hace cada vez más significativo. Como una parte de la luz incidente en el detector será luz parásita, la transmitancia aparente puede expresarse como:

$$T_{ap} = \frac{I_{detectada}}{I_{radiante}} = \frac{I + I_S}{I_0 + I_S} = \frac{I/I_0 + I_S/I_0}{I_0/I_0 + I_S/I_0} = \frac{T + S}{1 + S} \quad [3.18]$$

Donde S representa la fracción de luz incidente de origen externo y T es la transmitancia en ausencia de luz parásita. En términos de absorbancia ($A = -\log_{10} T$), los valores aparentes serán:

$$A_{ap} = -\log_{10} \left(\frac{T + S}{1 + S} \right) \quad [3.19]$$

El efecto de la luz parásita en las medidas de absorbancia es la desviación de la linealidad prevista por la ley de Beer-Lambert, dando lugar a valores más bajos de lo esperado. En la siguiente gráfica se muestra la relación entre la absorbancia real y la absorbancia medida para diferentes niveles de luz parásita (S), dados en porcentaje.

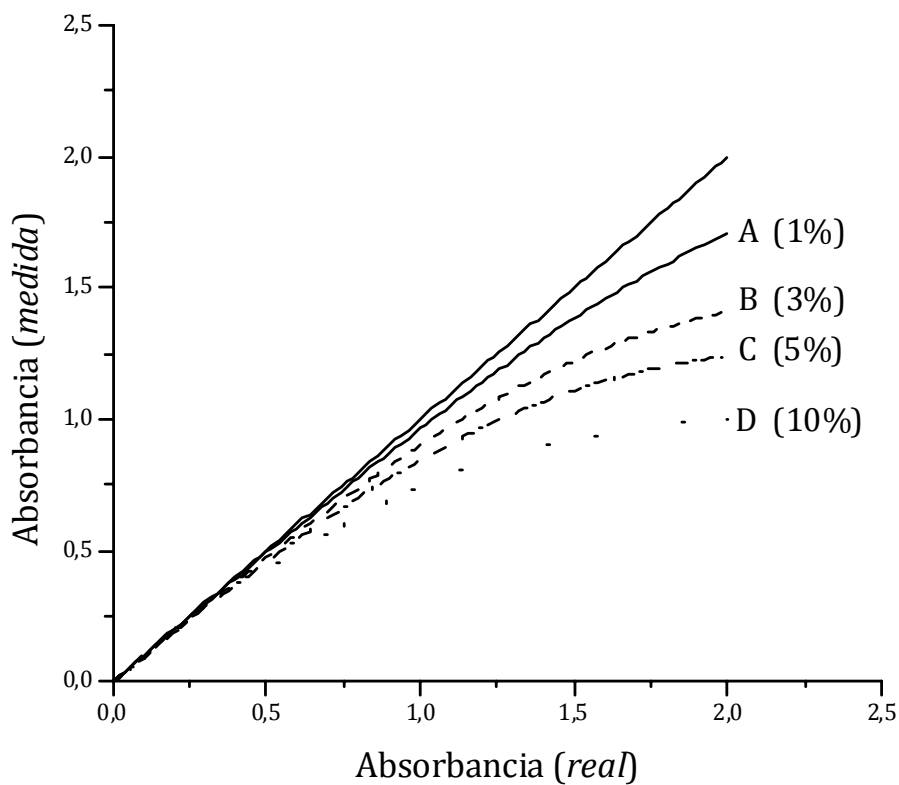


Figura 3.2.2. Representación de la absorbancia real frente a la absorbancia medida a diferentes niveles de *stray light*. La línea recta sólida representa el caso ideal en que la absorbancia real y la medida coinciden (0% *stray light*).

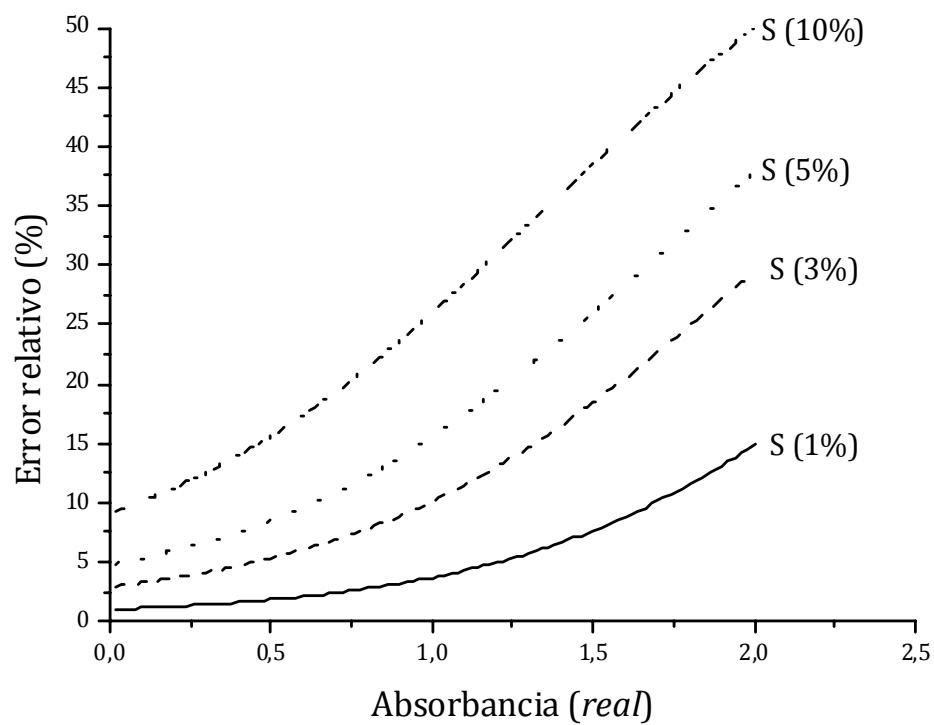


Figura 3.2.3. Error relativo de la absorbancia medida en función del nivel de luz parásita.

Observando las gráficas en la figura 3.2.3, podemos darnos cuenta de que la luz parásita puede afectar fuertemente nuestras medidas cuando las absorbancias que estamos midiendo son elevadas. Por ejemplo, con un 1% de luz parásita, las desviaciones al medir una absorbancia $A=1,69$ serían del 10%, mientras que con un 10% de luz parásita, nuestro error sería superior al 10% con medidas $A>0,1$.

En nuestro caso, una de las características que proporciona el fabricante del espectrofotómetro (Perkin Elmer) es la cantidad de luz parásita: **$S=3\%$** (a 290nm, en unidades de transmitancia). Para que, en nuestro caso, la desviación sea inferior al 5%, realizando los cálculos oportunos, debe cumplirse que: $A_{lim}\approx 0,414$. Utilizando las expresiones anteriores y empleando los valores relativos al espectrofotómetro ($A_{lim}=0,414$; $l=1\text{cm}$), sólo quedaría fijar un factor de dilución de la sonda en medio ácido para trabajar con una concentración óptima de cromóforo que permita una mayor ventana de valores sin que nuestras medidas se vean afectadas por un error que invalide los cálculos posteriores.

3.2.6. Hinchamiento de geles

En la medida experimental del hinchamiento de los hidrogeles es necesario tener en cuenta las condiciones en que han sido preparados y cómo evolucionan sus propiedades y las condiciones del entorno a lo largo del tiempo. La *primera condición* que debemos garantizar es que todas las medidas finales se realicen una vez se haya ***alcanzado el estado de equilibrio***, ya que un estado anterior daría información errónea y ante todo, invalidaría las hipótesis que sostienen nuestros cálculos.

La *segunda condición* que debemos garantizar es que las ***condiciones experimentales sean estables*** y garanticen la ***repetitibilidad de las medidas***. Es indudable que todas las medidas van a estar sometidas a una cierta variabilidad pero las condiciones que fijemos deben ser las mismas (dentro de un margen aceptable) para poder comparar los resultados entre sí.

Finalmente, una *tercera condición* deseable es la de emplear ***métodos complementarios*** que nos den información adicional sobre nuestras medidas. De este modo, tendremos más elementos de juicio a la hora de argumentar nuestras conclusiones.

3.2.6.1. Preparación de las muestras

Para preparar las muestras de este trabajo, se seleccionaron trozos de gel liofilizados a partir de los discos suministrados (ver apartado 3.3.1). Su geometría era irregular, aunque generalmente en forma de sectores circulares con gran rugosidad en sus caras paralelas. Los fragmentos elegidos tenían un peso comprendido entre 11,2mg y 78mg, aunque las muestras definitivas tenían un peso comprendido entre 44mg y 78mg. La proporción entre el gel y la disolución se ajustó en todos los casos para conseguir 1g de gel por cada litro de disolución, de modo que el valor de la concentración efectiva fuera la misma en todos los casos. Además, este valor de concentración se encuentra en otros trabajos [29], lo que permite la comparación de los resultados.

El cálculo de la concentración efectiva se realiza del siguiente modo. En el apartado 2.2 expresábamos la concentración molar efectiva como el número molar de unidades aceptoras de carga por unidad de volumen de disolución:

$$C = \frac{m_0}{M_0 V_T} \quad [2.23]$$

En esta ecuación, m_0 es la masa del gel presente en un volumen V_T de disolución y M_0 es el peso molecular de un monómero con el grupo aceptor de carga. Por otra parte, llamamos \bar{M}_c al peso molecular promedio de una cadena entre dos puntos de entrecruzamiento. El número de monómeros entre dos puntos de entrecruzamiento será entonces: $x_c = \bar{M}_c / M_0$. Si ahora definimos la densidad de cadenas como:

$$v_e = \frac{\rho_2}{\bar{M}_c} \quad [3.20]$$

Combinando los anteriores parámetros, podemos expresar la concentración efectiva como:

$$C = \frac{m_0 x_c v_e}{\rho_2 V_T} \quad [3.21]$$

Con esta expresión podemos calcular directamente la densidad efectiva del hidrogel, ya que la masa de gel y el volumen de disolución son magnitudes que nosotros podemos elegir y el resto de los parámetros (x_c , v_e , ρ_2) son característicos del gel⁴.

3.2.6.2. Determinación del punto de equilibrio

Como ya se vio en el capítulo anterior, los diferentes *potenciales* que contribuyen al hinchamiento de un gel en una disolución alcanzan finalmente un balance en el estado de equilibrio, dando lugar a un gel con una propiedades determinadas. Así, hemos visto cómo el pH, la concentración de otros iones o el tipo de disolvente influyen en las propiedades finales del gel hinchado.

Resulta, por tanto, útil conocer el tiempo mínimo necesario para garantizar que el sistema ha alcanzado el equilibrio. Definimos el **tiempo de estabilización** (t_s) como el tiempo transcurrido hasta que el pH de una disolución evoluciona un 95% hacia su valor de equilibrio.

Cuando un hidrogel de poli-(N-vinilimidazol) se hincha en una disolución acuosa, el pH de la disolución también varía progresivamente. En la práctica se puede ajustar la variación de pH en la disolución a una ley exponencial:

$$\text{pH}(t) = \text{pH}_i + \Delta_{\text{pH}}(1 - e^{-k_{\text{pH}}t}) \quad [3.22]$$

El pH de la disolución variará desde pH_i hasta un valor de equilibrio: $\text{pH}_s = \text{pH}_i + \Delta_{\text{pH}}$. Si la variación es exponencial, entonces tendremos una constante de tiempo k_{pH} que nos dará una idea de la rapidez con que se alcanza el equilibrio. El tiempo de estabilización que antes hemos definido será:

$$\frac{\text{pH}(t_s) - \text{pH}_i}{\Delta_{\text{pH}}} \cdot 100 = 95\% \quad [3.23]$$

⁴ Los valores tomados como referencia para estos parámetros de los hidrogeles PVI40(2) figuran en el apartado 3.3.1, así como las referencias bibliográficas donde se citan dichos valores. En este trabajo se considerarán como valores reales y exactos.

Por lo tanto:

$$1 - e^{-k_{pH}t_S} = 0,95 \quad [3.24]$$

Despejando t_S en la ecuación anterior, obtenemos que: $t_S \approx 3/k_{pH}$. Este cálculo nos da una buena estimación del tiempo que tarda en alcanzarse el equilibrio y por consiguiente, cuánto tiempo debe permanecer una muestra en disolución antes de medir su grado de hinchamiento. Otra ventaja que tiene este ajuste exponencial es que nos permite estimar el valor del pH de la disolución en el equilibrio (pH_S) a través de todos los puntos experimentales, en lugar de calcular el promedio de las últimas observaciones o el promedio de varias medidas una vez alcanzado el equilibrio.

3.2.6.3. Medida del grado de hinchamiento del hidrogel

Una vez alcanzado el equilibrio, mediremos el grado de hinchamiento del hidrogel como la variación en peso entre el gel hinchado y el gel seco, según la fórmula:

$$S = \frac{m_h - m_0}{m_0} \quad [3.25]$$

A partir del valor del grado de hinchamiento podemos derivar también una expresión para otros parámetros que necesitamos determinar para calcular el valor del pH en el interior del hidrogel. Si recurrimos a la ecuación [2.27], descrita en el apartado 2.2.3, además del pH inicial y de equilibrio de la disolución, necesitamos calcular los valores de σ (fracción de líquido que permanece en el sobrenadante una vez alcanzado el equilibrio) y del cociente de concentraciones C_G/C (la concentración molar C_G de unidades aceptoras de carga depende, a su vez, de la fracción en volumen de del hidrogel hinchado, v_2).

En el hidrogel hinchado, la fracción en volumen de hidrogel es el cociente entre el volumen que ocupa el gel y el volumen del gel más el volumen del líquido confinado en el gel. Escribiendo los volúmenes como cocientes de masas y densidades:

$$v_2 = \frac{m_0/\rho_2}{\frac{m_0}{\rho_2} + \frac{m_h - m_0}{\rho_1}} \quad [3.26]$$

Reorganizando los términos, llegamos a una expresión que nos permite calcular la fracción en volumen del gel hinchado en función del grado de hinchamiento (que calculamos a partir de las pesadas en el laboratorio) y de las densidades de las fases (valores conocidos):

$$v_2 = \left(1 + S \frac{\rho_2}{\rho_1}\right)^{-1} \quad [3.27]$$

Si ahora partimos de las ecuaciones [2.25-2.27] del apartado 2.2.3 y tenemos en cuenta el resultado anterior, el cociente C_G/C se puede expresar como:

$$\frac{C_G}{C} = \frac{v_2 \rho_2 V_T}{m_0} = \frac{\rho_2 V_T}{m_0} \left(1 + S \frac{\rho_2}{\rho_1}\right)^{-1} \quad [3.28]$$

Nuevamente obtenemos una expresión que sólo depende de valores conocidos y de magnitudes que podemos determinar experimentalmente. Finalmente, en el apartado 2.2.3 habíamos dado una expresión para σ que la relacionaba con la fracción en volumen del gel y con el cociente C_G/C de concentraciones. Podemos hacer uso de las dos ecuaciones anteriores y efectuar las sustituciones necesarias. Finalmente obtendremos:

$$\sigma = 1 - \frac{m_h - m_0}{\rho_1 V_T} = 1 - \frac{S m_0}{\rho_1 V_T} \quad [3.29]$$

Además de venir también expresada en función de valores conocidos experimentalmente, podemos advertir que la expresión muestra evidente su sentido físico (como fracción de líquido sobrenadante, no retenido en el interior del gel).

3.2.6.4. Medida de tiempos de vida de fluorescencia en geles hinchados

Si la disolución en la que se hincha el gel contiene, a su vez, una cierta cantidad de sonda fluorescente, una parte de ésta pasará a la fase líquida en el interior del gel o podrá quedar inmovilizada por el gel, lo que nos permitirá obtener el decaimiento de la sonda influido por las propiedades del gel. De modo que podremos comparar los decaimientos de la sonda libre en disolución con la sonda retenida por el hidrogel.

Hay una característica importante a la hora de poder comparar estos resultados y es la diferencia que puede aparecer entre las medidas en disolución y las medidas de muestras sólidas. Para las medidas de fluorescencia de los geles hinchados se empleó la cubeta de metacrilato modificada que se describe en el apartado 3.1.4. Su diseño permite contener una muestra de gel hinchado con una orientación de 45° respecto de los ejes de excitación de la fuente y de entrada del monocromador. El número de cuentas por segundo registrado por el detector fue muy similar al obtenido con la sonda en disolución.

3.2.6.5. Medida del cambio en la concentración de la sonda en disolución

Como hemos dicho anteriormente, algunas medidas complementarias resultan útiles para caracterizar mejor el sistema. En el caso de los hidrogeles, se observó una menor intensidad de color en la disolución sobrenadante cuando los geles se hinchan, adquiriendo estos el color de la sonda libre en disolución; siendo estos de un color blanco traslúcido cuando son hinchados en ausencia de cromóforos externos).

Por ese motivo, se obtuvieron los espectros de absorción de la sonda en el sobrenadante (en las mismas condiciones que los demás espectros de absorción) una vez alcanzado el equilibrio. La comparación de los valores de absorbancia con los espectros de absorción de referencia de la sonda nos puede ayudar a cuantificar los posibles cambios de concentración.

3.3. Materiales

En esta sección presentamos los materiales, reactivos y sustancias empleadas en este trabajo, indicando sus propiedades (valores de referencia y valores calculados), procedencia, tratamientos previos y métodos de obtención/purificación (si corresponde).

3.3.1. Hidrogeles de poli(N-vinilimidazol)

Los hidrogeles de poli(N-vinilimidazol) fueron suministrados por cortesía de la Prof. Dra. D^a. Inés Fernández de Piérola (Dpto. Ciencias y Técnicas Fisicoquímicas, Fac. Ciencias, UNED). En diversas publicaciones [29-30,40-43,46] ha presentado las propiedades de estos geles, que nosotros tomamos como valores de referencia para los cálculos posteriores y que ahora reproducimos en la tabla adjunta.

Los hidrogeles PVI40(2) fueron sintetizados por polimerización radical con entrecruzamiento de *N-vinilimidazol* (Aldrich) y *N,N'-metilbisacrilamida* (Aldrich) en disolución acuosa, con *AIBN* (Fluka, $6 \cdot 10^{-3}$ M) como iniciador. El agua empleada fue destilada y desionizada en un sistema Milli-Q (Millipore). La nomenclatura empleada para estos hidrogeles indica que la concentración de comonómeros fue de 40g/100ml y con una relación de entrecruzantes en la mezcla de comonómeros del 2%.

Propiedad	Valor
<i>Monómeros por punto de entrecruzamiento</i>	$x_c = 340$
<i>Densidad de cadenas de hidrogel</i>	$\nu_e = 0,036 \text{ mol/l}$
<i>Densidad del hidrogel</i>	$\rho_2 = 1,25 \text{ g/cm}^3$
<i>Máximo grado de hinchamiento</i>	$S_{max} = 20 \text{ g/g}$ ($pH_i = 2$)
<i>Mínimo grado de hinchamiento</i>	$S_{min} = 5 \text{ g/g}$ ($pH_i > 4$)

Tabla 3.3.1. Propiedades características de los hidrogeles PVI40(2)

Los geles fueron suministrados como discos liofilizados de 4mm de espesor y unos 10-12mm de diámetro. Se mantuvieron almacenados en un vial cerrado y sellado con film de parafina, a temperatura ambiente y alejados de otros productos químicos. Los trozos de gel empleados se cortaron en el momento previo a su hinchamiento, seleccionando aquellos que tenían un peso aproximado de entre 20 y 80 miligramos.



Figura 3.3.1. Dos muestras de hidrogeles PVI40(2)

3.3.2. Sondas fluorescentes

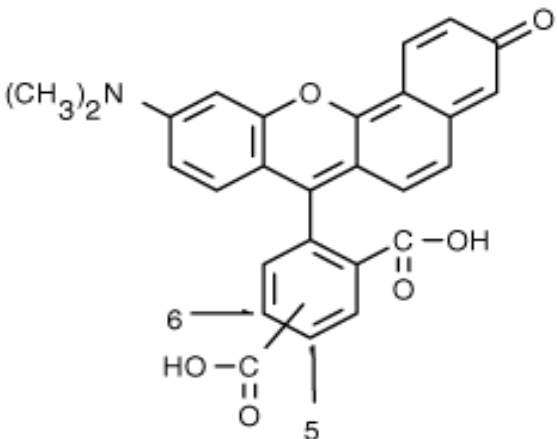
A lo largo de este trabajo se han usado diversas sondas fluorescentes, cuya caracterización fotofísica ha servido para desarrollar una buena parte del trabajo. Dado que los experimentos llevados a cabo requieren una alta reproducibilidad, se precisaron materiales de pureza muy elevada, que permitieran asegurar que dos muestras distintas en las mismas condiciones serían capaces de reproducir los mismos resultados (dentro de los límites aceptables de incertidumbre experimental que introducen el ambiente, el instrumental y la intervención del operario).

En un primer lugar, se empleó Rhodamina B como estándar de referencia para el cálculo de tiempos de vida. Aunque se propuso recurrir a otros estándares, su baja solubilidad en agua nos permitió descartarlos para evitar preparar muestras de concentración desconocida.

Una de las primeras sondas fluorescentes elegidas para su aplicación como sonda sensible al pH fue la fluoresceína. Existen multitud de propuestas y aplicaciones [50,60] en las que se usa la fluoresceína como una sonda sensible al pH. Por tanto, dedicamos en este trabajo una parte a su caracterización fotofísica.

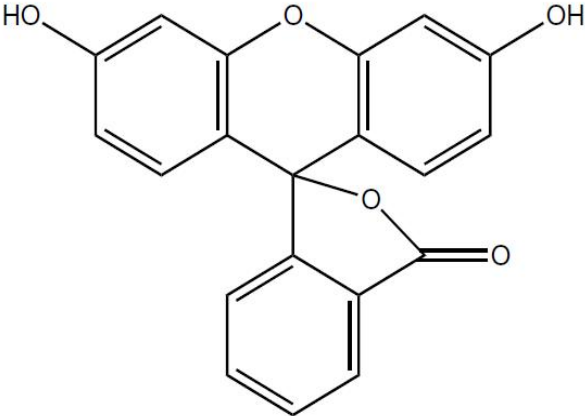
Después de descartar la fluoresceína como sonda idónea para nuestro trabajo, decidimos recurrir a una sonda relativamente nueva, fabricada por Invitrogen (Molecular Probes Inc.) y cuyo nombre comercial es: C-SNARF-1 (5-6-carboxi-seminaftorhodafluor-1). En la determinación del rendimiento cuántico de esta sonda se utilizó Rhodamina 6G

(Sigma-Aldrich) como sustancia de referencia. A continuación se muestran las fichas de datos básicos de las sondas fluorescentes utilizadas en este trabajo.

C-SNARF-1		Estructura química 
Fórmula Molecular:	C ₂₇ H ₁₉ NO ₆	
Peso Molecular:	453,45 g/mol	
Tipo de molécula: Fluorescente, seminaftorhodafluor		
Rango típico de pH: 6,0–9,0		
pK_a: 7,5		
Núm. Reg. CAS: 126208-12-6		
Fabricante: <i>Invitrogen</i>		

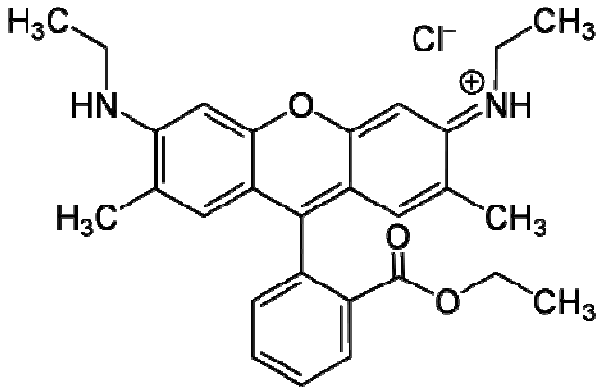
Aspecto: Agregado violáceo oscuro (en escamas)
Solubilidad: Soluble en agua y en disolventes orgánicos polares.
Principales Aplicaciones: microscopía confocal de fluorescencia, citometría de flujo y aplicaciones en microscopía para la medición del pH intracelular.
Seguridad/Toxicidad: No hay descritas contraindicaciones específicas para este producto.

Tabla 3.3.2. Propiedades características de la sonda fluorescente: C-SNARF-1

FLUORESCÉINA		Estructura química 
Fórmula Molecular:	C ₂₀ H ₁₂ O ₅	
Peso Molecular:	332,31 g/mol	
Tipo de molécula: Fluorescente, derivado del Xanteno		
Rango típico de pH: 4,0–6,0		
pK_a: 2,2; 4,4; 6,7		
Núm. Reg. CAS: 2321-07-5 Fabricante: <i>Sigma-Aldrich</i> T_{fusión}: 315°C (se descompone)		

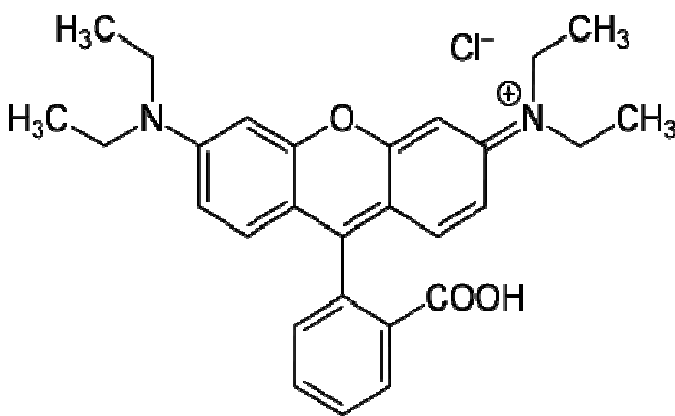
Aspecto: Polvo rojo amarillento
Solubilidad: Poco soluble o insoluble en agua, éter, benceno y cloroformo. Soluble en etanol, metanol, acetona, etilacetato, <i>N,N</i> -dimetilformamida.
Principales Aplicaciones: LED orgánico, displays de cristal liquid, cosméticos, síntesis y secuenciación de ácidos nucleicos, diagnóstico de retinopatía diabética, estudio de anticuerpos y actividad enzimática.
Seguridad/Toxicidad: reacciones adversas (en casos de cataratas oculares), toxicidad celular (en estudios celulares) o riesgo mutagénico (en cosméticos).

Tabla 3.3.3. Propiedades características de la sonda fluorescente: fluoresceína

RHODAMINA 6G		Estructura química 
Fórmula Molecular:	C ₂₈ H ₃₁ N ₂ O ₃ Cl	
Peso Molecular:	479,02 g/mol	
Tipo de molécula: Fluorescente, fluorona (derivado)		
Rendimiento cuántico:	0,94 (EtOH)	
Tiempo de vida (τ): 4,1 ns (H ₂ O)		
Núm. Reg. CAS: 989-38-8		
Fabricante: <i>Sigma-Aldrich</i>		
T_{fusión}: 290°C (se descompone)		

Aspecto: Polvo rojo oscuro
Solubilidad: Su solubilidad en agua es de 20 g/l (25 °C). En metanol su solubilidad puede alcanzar 400 g/l.
Principales Aplicaciones: Tinte fluorescente de uso general en microscopía de fluorescencia, ensayos inmunológicos, citometría de flujo; aplicaciones láser.
Seguridad/Toxicidad: posible sustancia cancerígena.

Tabla 3.3.4. Propiedades características de la sonda fluorescente: rhodamina 6G.

RHODAMINA B		Estructura química 
Fórmula Molecular:	C ₂₈ H ₃₁ N ₂ O ₃ Cl	
Peso Molecular:	479,02 g/mol	
Tipo de molécula:		
Fluorescente, fluorona (derivado)		
Rendimiento cuántico: >0,65 (EtOH)		
Tiempo de vida (τ): 1,7ns (H ₂ O)		
Núm. Reg. CAS: 81-88-9		
Fabricante: <i>Sigma-Aldrich</i>		
T_{fusión}:	210-211°C (se descompone)	

Aspecto: Polvo rojo oscuro
Solubilidad: Su solubilidad en agua es de 50 g/l. En ácido acético (30% vol.) su solubilidad puede alcanzar 400 g/l.
Principales Aplicaciones: de uso general en microscopía de fluorescencia, ensayos inmunológicos, citometría de flujo; aplicaciones láser; biomarcador para pruebas en aguas.
Seguridad/Toxicidad: posible sustancia cancerígena.

Tabla 3.3.5. Propiedades características de la sonda fluorescente: rhodamina B.

3.3.3. Disolventes y otros reactivos

Como disolvente se empleó agua destilada desionizada (Fluka). En la preparación de muestras, regulación de pH y valoraciones ácido-base se emplearon disoluciones comerciales (Sigma-Aldrich) de ácido clorhídrico e hidróxido sódico de diferentes concentraciones. El imidazol empleado en valoraciones y disoluciones tampón es de origen comercial (Sigma-Aldrich). Las disoluciones tampón comerciales y las sales de fosfato utilizadas para preparar disoluciones tampón son de Panreac S.A.U [73].

En el apéndice A.4 se detallan las propiedades de los tampones comerciales, así como de los tampones de imidazol y fosfato que se prepararon en el laboratorio. A continuación se incluyen algunos datos característicos de los disolventes y reactivos anteriormente descritos.

<i>Producto</i>	<i>Fórmula</i>	<i>Fabricante</i>	<i>Características</i>
<i>Agua</i>	<i>H₂O</i>	<i>Fluka</i>	<i>Destilada desionizada</i>
<i>Ácido clorhídrico 0,1M</i>	<i>HCl</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>	<i>0,1M - ρ=1 g/ml @20°C</i>
<i>Ácido clorhídrico 37%</i>	<i>HCl</i>	<i>Panreac</i>	<i>37% - ρ=1,19 g/ml @20°C</i>
<i>Hidróxido sódico 0,1N</i>	<i>NaOH</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>	<i>0,10±0,05N - ρ=1 g/ml @25°C</i>
<i>Hidróxido sódico 0,5N</i>	<i>NaOH</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>	<i>0,50±0,01N - ρ=1,02 g/ml @25°C</i>
<i>Fosfato monosódico anhidro</i>	<i>NaH₂PO₄</i>	<i>Panreac</i>	<i>M_w = 119,98 g/mol (anhidro)</i>
<i>Fosfato disódico anhidro</i>	<i>Na₂HPO₄</i>	<i>Panreac</i>	<i>M_w = 141,96 g/mol (anhidro)</i>

Tabla 3.3.6. Propiedades básicas de los disolventes y reactivos

3.3.4. Otros materiales

Todas las muestras y disoluciones fueron preparadas en recipientes de vidrio, convenientemente lavadas y adecuadas a su uso. No fue preciso emplear ningún tratamiento químico o térmico a los recipientes. Todos los matraces y viales fueron usados con su tapón correspondiente y sellados con tira de parafina. Los vasos de precipitados, matraces, pipetas y buretas fueron lavados con agua destilada (y una mezcla de H₂O₂/NaOH, cuando fue necesario) y secados en un horno a 150 °C. El material con las muestras fue convenientemente etiquetado y almacenado en frío (~4 °C), o conservado a temperatura ambiente en cajas también etiquetadas.

Para evitar una posible contaminación, algunos de los recipientes fueron empleados exclusivamente para la preparación de muestras fluorescentes, separándolos del resto de vasos, viales y matraces. Todo el material desechable fue eliminado, vertiendo los residuos en los recipientes destinados a tal efecto (para disolventes halogenados o no halogenados) y los utensilios de vidrio en el contenedor de vidrios contaminados.

*Un experimento es la espada templada
que puedes empuñar con éxito contra los espíritus de la oscuridad
pero que también puede derrotarte vergonzosamente.*

Erwin Schrödinger

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

4.1. Caracterización optoelectrónica de las fuentes de excitación

Los resultados presentados en este apartado están dirigidos a la caracterización general de las dos fuentes de excitación disponibles: **PLS-8-2-218** y **PLS-8-2-372**, ambas suministradas por PicoQuant GmbH. Debido a que las sondas fluorescentes empleadas se excitan en el rango visible del espectro, la fuente elegida para su excitación fue la **PLS-8-2-218**. Por este mismo motivo, hay algunos resultados adicionales que sólo se han calculado para esta fuente.

4.1.1. Monitorización de la señal de disparo de los pulsos de excitación

Tal como fue descrito en el apartado 3.2.1, el generador PDL 800-B permite usar frecuencias de 40MHz, 20MHz, 10 MHz, 5 MHz y 2,5 MHz. En las gráficas siguientes se muestran las formas de los pulsos para cada una de estas frecuencias, medidas con el osciloscopio **Hameg HM303-3**. Cada gráfica tiene dos señales: el pulso generado directamente por la unidad 800-B (**PLD**, línea delgada) y la señal acondicionada (**Sync Out**, línea gruesa) por el elemento TTL de sincronización con la tarjeta de adquisición de datos TimeHarp200.

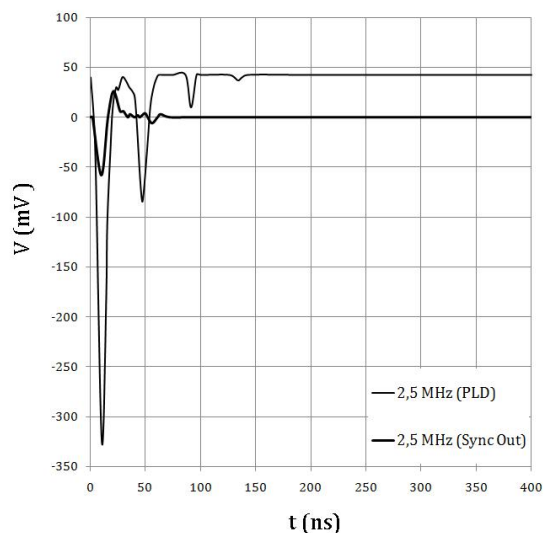


Figura 4.1.1. Señal de disparo a 2,5MHz

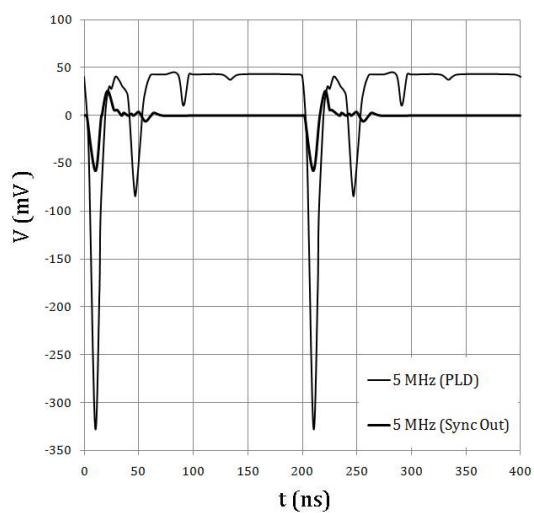


Figura 4.1.2. Señal de disparo a 5MHz

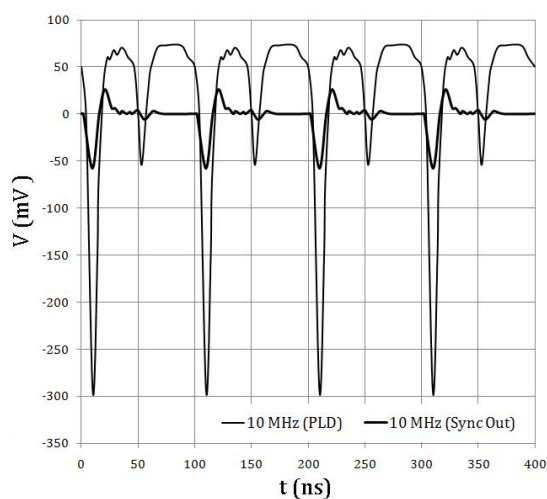


Figura 4.1.3. Señal de disparo a 10MHz

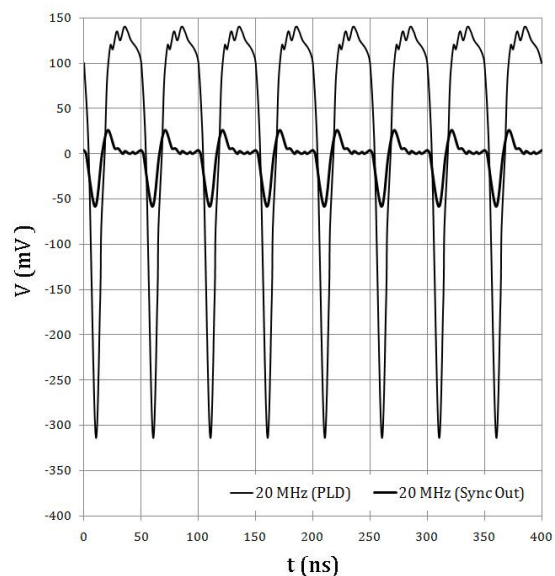


Figura 4.1.4. Señal de disparo a 20MHz

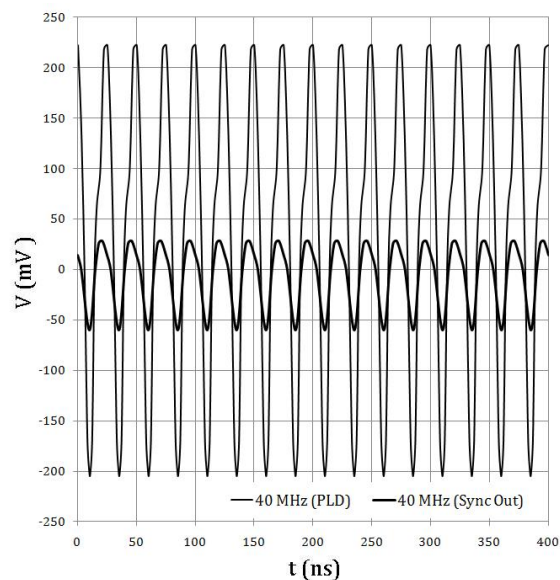


Figura 4.1.5. Señal de disparo a 2,5MHz

4.1.2. Optimización por software de los parámetros de la señal

Independientemente de la fuente de excitación que empleemos, hay dos parámetros cuyos valores nos permiten ajustar la forma y la posición del decaimiento: la escala de tiempos y el delay externo. Esto es así debido a que el software de adquisición de datos, al modificar la frecuencia y la resolución modifica también la escala gráfica de tiempos y el uso interno de memoria. A continuación se presenta una tabla con los valores de la máxima resolución permitida por el software (en la cuarta columna) para cada frecuencia, calculada a partir del desarrollo que hemos hecho en el apartado 3.2.1. Se ha comprobado comparando el período de la señal (en la segunda columna) con la ventana de tiempos (en la quinta columna) que ofrece el software para la resolución óptima.

<i>Frecuencia</i>	ΔT	$R > \Delta T / 4096$	<i>Resolución máxima (TimeHarp 200)</i>	$\Omega = 4096 \cdot R$
40MHz	25ns	6ps	39ps	159,33ns
20MHz	50ns	12ps	39ps	159,33ns
10MHz	100ns	24ps	39ps	159,33ns
5MHz	200ns	49ps	78ps	318,67ns
2,5MHz	400ns	98ps	156ps	637,34ns

Tabla 4.1.1. Máxima resolución disponible en función de la frecuencia.

Dado que $\Omega > \Delta T$, esto implica que el programa discrimina una serie de canales que no son utilizados. Además, se ha observado que al cambiar la resolución, cambia el límite superior de la ventana de tiempos, con independencia de la frecuencia. Utilizando los valores de la tabla anterior, los límites de la ventana de tiempos real y tomando como referencia el valor de 4096 canales, podemos calcular de forma aproximada el porcentaje de bloques de memoria utilizados (N_{UT}) y el porcentaje de bloques de memoria discriminados (N_{DISC}), tal como se muestra en la tabla siguiente.

<i>Frecuencia</i>	R	$\Omega = 4096 \cdot R$	Ω_{real}	N_{UT}	N_{DISC}
40MHz	39ps	159,33ns	112ns – 137ns	16%	84%
20MHz	39ps	159,33ns	87ns – 137ns	31%	69%
10MHz	39ps	159,33ns	37ns – 137ns	63%	37%
5MHz	78ps	318,67ns	97ns – 297ns	63%	37%
2,5MHz	156ps	637,34ns	215ns – 615ns	63%	37%

Tabla 4.1.2. Rendimiento del uso de los canales de memoria en función de la frecuencia

Para establecer el *delay óptimo*, δ_{opt} , tal como lo definimos anteriormente, se midieron de forma continua los decaimientos de una dispersión de LUDOX. Se ajustó el

delay externo hasta desplazar el comienzo de los decaimientos un 5% del primer canal del histograma. Este ajuste se realizó para las dos fuentes de excitación a cada una de las cinco frecuencias disponibles. La intensidad de la fuente se reguló para conseguir un conteo en el detector superior a 1000cps. Los resultados se muestran en la tabla siguiente:

Frecuencia	δ_{opt} (PLS-8-2-218)	δ_{opt} (PLS-8-2-372)
40MHz	22ns	21ns
20MHz	22ns	20ns
10MHz	18ns	17ns
5MHz	10ns	15ns
2,5MHz	6ns	14ns

Tabla 4.1.3. Delay óptimo en función de la frecuencia para ambas fuentes de excitación

4.1.3. Variación de la intensidad con la frecuencia de pulsación

Tal como se describe en el apartado 3.2.1, se midieron, para cada frecuencia, los conteos promedios para diferentes intensidades. Se seleccionaron longitudes de onda de 493nm y 343nm para las fuentes visible y ultravioleta, respectivamente. La muestra del portamuestras era una solución dispersante de LUDOX. La apertura de las rendijas del monocromador se mantuvo a 2,5mm en todos los casos. Por encima de este valor no se consiguen mejores resultados, de forma que con esta apertura se consigue un máximo orientativo que resulta aceptable. Dado que el ruido de fondo del detector es de aproximadamente 200 cuentas por segundo ($N_{PMT} \sim 200\text{cps}$), se obviaron los valores próximos a esta cantidad. Así se explica, por ejemplo, por qué a 40 MHz la fuente ultravioleta (PLS-8-2-372) resulta de poca utilidad.

<i>PLS-8-2-218 – Conteo del detector (cps) @493nm</i>					
Intensidad	$f=40\text{MHz}$	$f=20\text{MHz}$	$f=10\text{MHz}$	$f=5\text{MHz}$	$f=2,5\text{MHz}$
75%	800	1500	500	570	---
80%	2900	3400	1000	950	330
85%	6500	6000	1900	1400	480
90%	9000	7700	3100	1900	700
95%	11000	9000	3700	2300	950
100%	13700	11000	4700	2800	1100

Tabla 4.1.4. Conteo en función de la intensidad y de la frecuencia de la fuente PLS-8-2-218

PLS-8-2-372 – Conteo del detector (cps) @343nm

<i>Intensidad</i>	<i>f=40MHz</i>	<i>f=20MHz</i>	<i>f=10MHz</i>	<i>f=5MHz</i>	<i>f=2,5MHz</i>
70%	---	---	1000	2300	1400
75%	---	480	2500	4000	2300
80%	---	1500	4900	6400	3500
85%	---	4000	7900	9300	5000
90%	300	7700	11500	13700	7300
95%	830	12800	16000	19400	10200
100%	2700	19000	22200	27000	13800

Tabla 4.1.5. Conteo en función de la intensidad y de la frecuencia de la fuente PLS-8-2-372

4.1.4. Medida del ancho espectral y ancho de pulso

El ancho espectral de las fuentes de excitación se obtuvo a partir de los decaimientos de la lámpara (medidos con una dispersión de LUDOX como muestra) a diferentes longitudes de onda. Con el modo **TRES** de operación del fluorímetro, se puede automatizar la medida de varios decaimientos en un intervalo de longitudes de onda. Posteriormente, con el software **FluoPlot** (PicoQuant GmbH), se puede obtener una gráfica que representa la intensidad integrada de cada decaimiento en función de la longitud de onda.

Con este espectro se calcula el ancho espectral (Δ) a partir de las longitudes de onda λ_1 y λ_2 , tales que su intensidad sea la mitad que la intensidad máxima $I_{\lambda_1} = I_{\lambda_2} = 1/2I_{MAX}$ (FWHM). Se han tenido en cuenta los valores discretos de longitudes de onda a la hora de establecer la precisión del ancho espectral.

	<i>Frecuencia</i>	λ_{MAX}	<i>Ancho espectral ($\Delta = FWHM$)</i>	
PLS-8-2-372	10 MHz	341nm	14nm	335nm – 349nm
	10 MHz	486nm	18nm	479nm – 497nm
PLS-8-2-218	20 MHz	486nm	29nm	477nm – 506nm

Tabla 4.1.6. Ancho espectral (Δ) de las fuentes de excitación

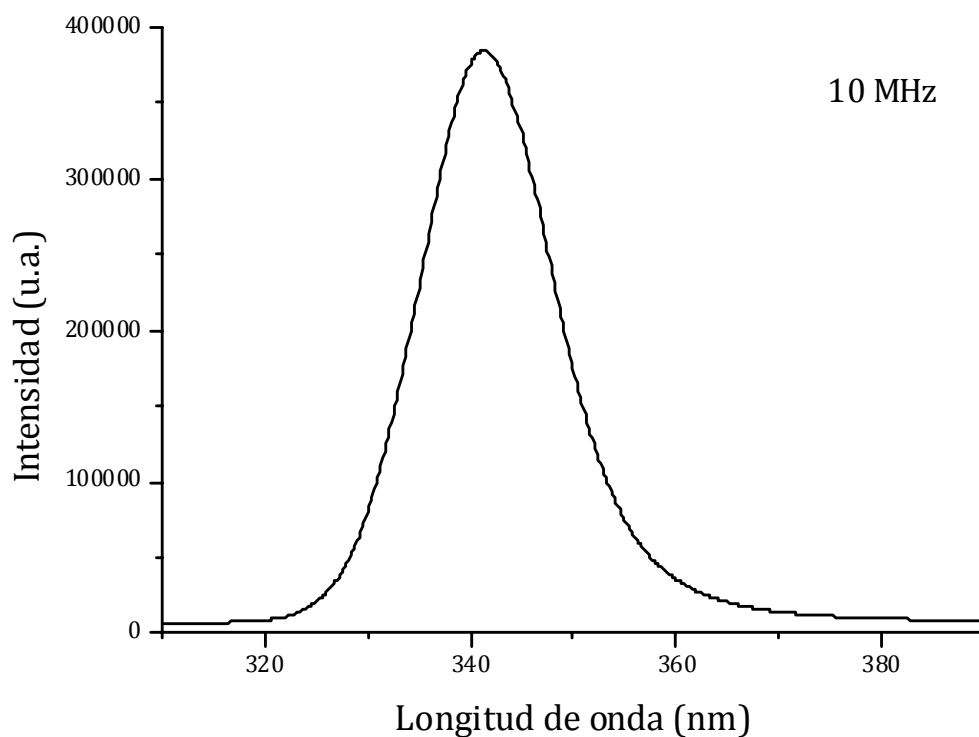


Figura 4.1.6. Espectro de emisión de la fuente PLS-8-2-372 ($f=10\text{MHz}$)

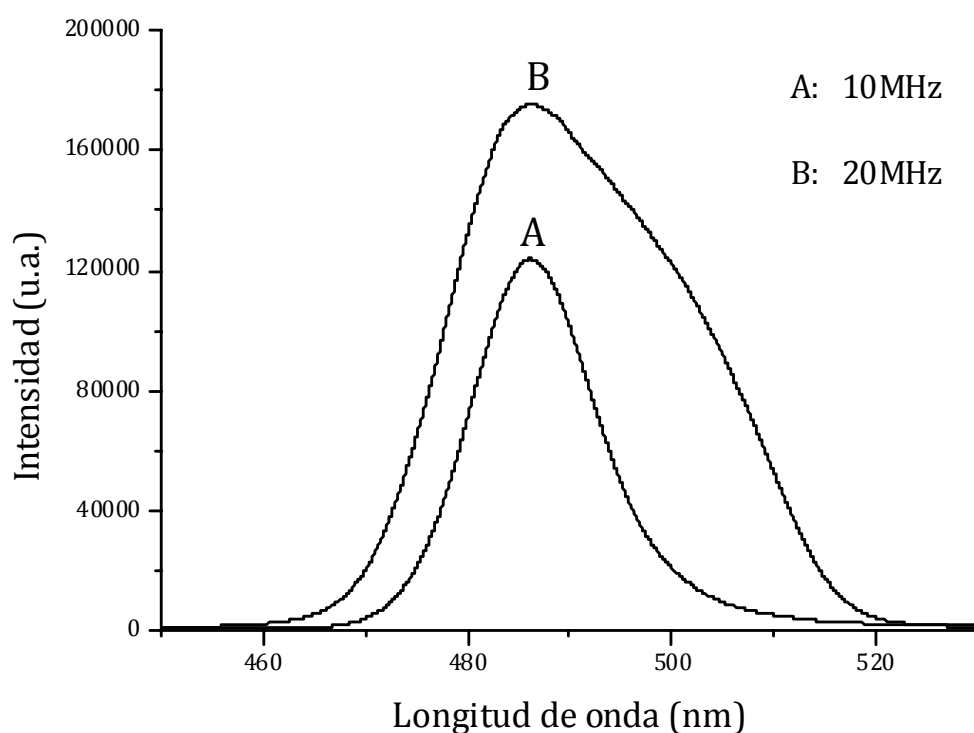


Figura 4.1.7. Espectro de emisión de la fuente PLS-8-2-218 (A: $f=10\text{MHz}$; B: $f=20\text{MHz}$)

Finalmente, para la fuente PLS-8-2-218 se calculó el ancho de pulso como el ancho completo a la mitad de la intensidad (FWHM). Para ello, se tomaron los decaimientos de intensidad de la fuente a dos frecuencias (10MHz y 20MHz). En la figura 4.1.8 se

representan los anchos de pulso medidos para cada decaimiento y con una línea horizontal se indican los valores promedios obtenidos para cada frecuencia, tal como aparecen en la tabla 4.1.7.

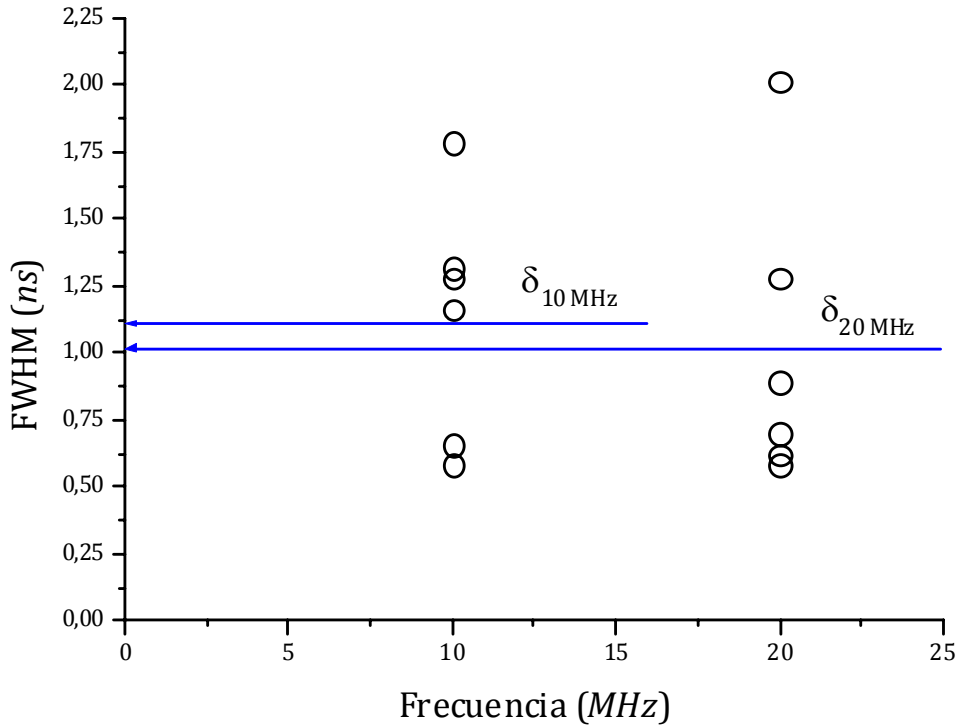


Figura 4.1.8. Ancho de pulso de la fuente PLS-8-2-218 a 10MHz y 20MHz

<i>f</i> = 10MHz		<i>f</i> = 20MHz	
<i>IRF</i>	δ_{IRF}	<i>IRF</i>	δ_{IRF}
1	0,5820ns	1	0,6208ns
2	0,6596ns	2	1,2804ns
3	1,3192ns	3	0,8924ns
4	1,1640ns	4	2,0176ns
5	1,2804ns	5	0,5820ns
6	1,7848ns	6	0,6984ns
$\langle \delta_{IRF} \rangle$	1,132ns	$\langle \delta_{IRF} \rangle$	1,015ns
σ	0,449ns	σ	0,554ns
$\delta_{10MHz} = 1,1 \pm 0,5ns$		$\delta_{20MHz} = 1,0 \pm 0,6ns$	
$\tau_{MIN} = 110ps$		$\tau_{MIN} = 100ps$	

Tabla 4.1.7. Ancho de pulso de la fuente PLS-8-2-218 para frecuencias de 10MHz y 20MHz

Asimismo, al final de la tabla se muestra el valor calculado del menor tiempo de vida ($\tau_{MIN} = \delta_{IRF}/10$) que puede resolverse por un método de deconvolución, utilizando la fuente PLS-8-2-218 con frecuencias de pulsación de 10MHz y 20MHz, respectivamente.

4.2. Caracterización fotofísica de sondas fluorescentes

Una vez establecidas las propiedades de las fuentes de excitación, pasamos a presentar nuestros resultados en la búsqueda de sondas fluorescentes sensibles al pH que sirvan para definir un método de medida del pH a través del tiempo de vida de fluorescencia. El primer paso consistió en comprobar la resolución del sistema, comparando los tiempos de vida calculados de algunas sondas fluorescentes con los valores de referencia citados en la literatura. Posteriormente, se buscó una sonda fluorescente con la que poner a prueba el método basado en el tiempo de vida de fluorescencia.

4.2.1. Medidas de tiempo de vida con un estándar de referencia

Para comprobar la resolución analítica del sistema, se procedió a calcular el tiempo de vida de fluorescencia de algunas sustancias de referencia. Recientemente, un grupo formado por once laboratorios de todo el mundo elaboró una extensa selección de compuestos de referencia. La tabla 4.2.1 presenta la lista con los tiempos de vida de los compuestos, los disolventes y los rangos de excitación y emisión.

<i>Compuesto</i>	<i>Disolvente</i>	<i>Tiempo de vida (ns)</i>	<i>$\lambda_{exc}(nm)$</i>	<i>$\lambda_{em}(nm)$</i>
Antraceno	metanol	$5,1 \pm 0,3$	295-360	375-442
	ciclohexano	$5,3 \pm 0,1$	295-360	375-442
9-cianoantraceno	metanol	16 ± 1	295-360	400-480
	ciclohexano	$12,7 \pm 0,7$	295-360	400-480
DPA	metanol	$8,7 \pm 0,5$	295-360	400-475
	ciclohexano	$7,5 \pm 0,4$	295-360	400-475
N-metilcarbazol	ciclohexano	$14,1 \pm 0,9$	290-325	350-400
Coumarina 153	metanol	$4,3 \pm 0,2$	295-442	495-550
Eritrosina B	agua	$0,089 \pm 0,003$	488-568	550-580
	metanol	$0,47 \pm 0,02$	488-568	550-590
NATA	agua	$3,1 \pm 0,1$	295-309	330-410
POPOP	ciclohexano	$1,12 \pm 0,04$	295-360	380-450
PPO	metanol	$1,65 \pm 0,05$	295-330	340-400
	ciclohexano	$1,36 \pm 0,04$	290-325	360-450
Rhodamina B	agua	$1,74 \pm 0,02$	488-575	560-630
	metanol	$2,5 \pm 0,1$	488-568	550-630
Rubreno	metanol	$9,9 \pm 0,3$	488, 514	550-610
SPA	agua	$31,2 \pm 0,4$	300-330	466-520
p-terfenil	metanol	$1,17 \pm 0,08$	284-315	330-380
	ciclohexano	$0,98 \pm 0,03$	290-315	330-390

Tabla 4.2.1. Compuestos utilizados como estándar de referencia de tiempos de vida. Tomado de: N. Boens et al.; *Anal. Chem.* 79-5, **2007**.

En la literatura es posible encontrar otras muchas sondas fluorescentes cuyo tiempo de vida sea perfectamente conocido, aunque consideramos la tabla precedente como una buena referencia para el investigador. Entre las sondas fluorescentes de esta tabla que están disponibles en el laboratorio, la única que podíamos excitar de modo eficiente era la rhodamina B.

En la tabla 4.2.2 se muestran los tiempos de vida obtenidos de los decaimientos de varias muestras de rhodamina B. El disolvente utilizado fue agua destilada desionizada (pH~7). Las disoluciones fueron introducidas en las cubetas de metacrilato descritas en el método experimental. Se utilizó la fuente PLS-8-2-218 a 10MHz, seleccionando la excitación a 486nm para obtener el decaimiento de la lámpara y midiendo el decaimiento de la muestra a 565nm. Comparando el valor promedio de estos decaimientos con la referencia de la tabla 4.2.1, podemos concluir que la resolución del sistema permite recuperar tiempos de vida con gran precisión.

<i>Muestra</i>	<i>Concentración</i>	τ (ns)	χ^2_R
1	1 μ M	1,715 \pm 0,001	1,074
2	2 μ M	1,734 \pm 0,003	1,038
3	5 μ M	1,706 \pm 0,004	1,079
4	10 μ M	1,736 \pm 0,008	1,121
5	20 μ M	1,732 \pm 0,002	1,058
<i>Promedio</i>		1,72\pm0,01	

Tabla 4.2.2. Tiempo de vida de fluorescencia de varias muestras de rhodamina B

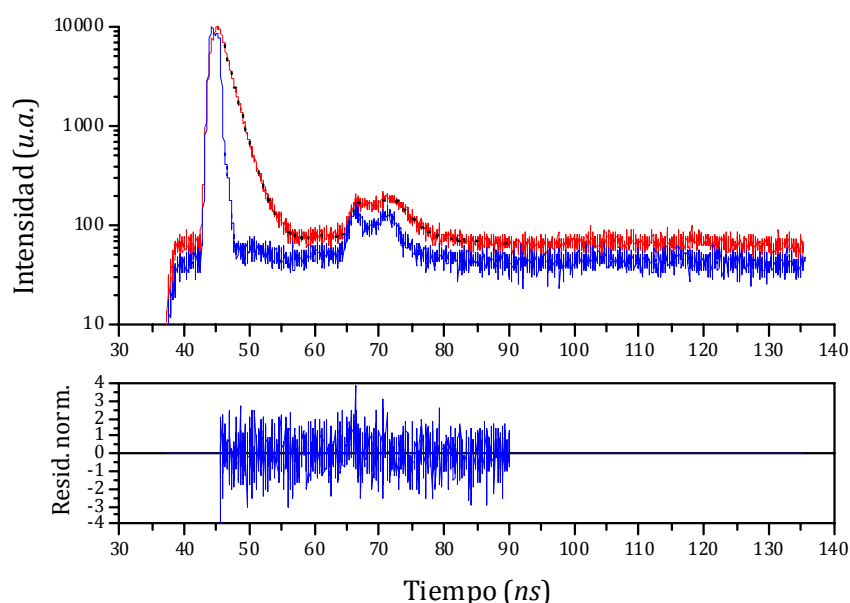


Figura 4.2.1. Decaimiento y residuos normalizados de una muestra de Rhodamina B (5 μ M); Exc: 486nm; Em: 565nm; f=10MHz; ($\chi^2_R = 1,079$).

4.2.2. Criterios de selección de sondas fluorescentes sensibles al pH

En segundo lugar, se buscó una sonda fluorescente sensible al pH que nos permitiera desarrollar el método fotofísico de determinación del pH en el interior del gel. Para ello, debía cumplir con los criterios de sensibilidad en la región del pH fisiológico, excitación eficiente en la región de máxima intensidad de la fuente PLS-8-3-218 (479nm-497nm) y disponer de algún dato en la literatura que indicara que su tiempo de vida se modifica en esta región de pH. La figura 4.2.2 muestra la distribución de alguna de las sondas candidatas. Los puntos han sido colocados en torno a la longitud de onda típica de excitación de la sonda. En la tabla 4.2.3 se relacionan las abreviaturas utilizadas en la gráfica con el nombre de los compuestos.

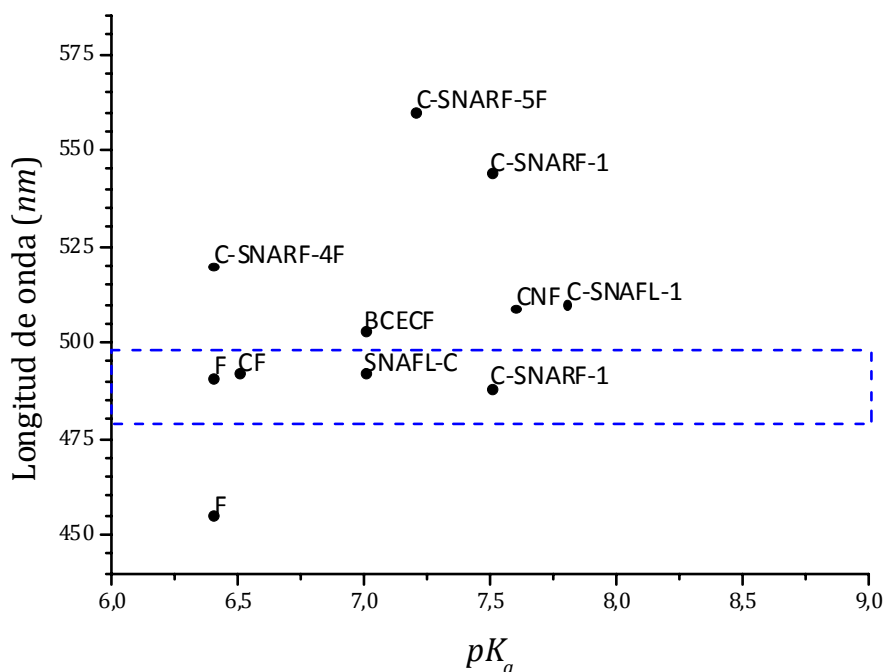


Figura 4.2.2. Excitación típica de sondas sensibles al pH, frente a su constante de disociación pK_a . La línea discontinua indica la región de excitación más eficiente para la fuente PLS-8-3-218

<i>Nombre</i>	<i>Abreviatura</i>	<i>pK_a</i>	<i>λ_{exc} (nm)</i>
Fluoresceína	F	6,4	455/491
Carboxi-seminaftorhodafluor-4F	C-SNARF-4F	6,4	520
Carboxifluoresceína	CF	6,5	492
Seminaftofluorona-calceína	SNAFL-c	7,0	492
2',7'-Bis-(2-carboxietil)-5-(6-)carboxifluoresceína	BCECF	7,0	503
Carboxi-seminaftorhodafluor-5F	C-SNARF-5F	7,2	560
Carboxi-seminaftorhodafluor-1	C-SNARF-1	7,5	488/544
5-(6)-carboxinaftofluoresceína	CNF	7,6	509
5-(6)-carboxi-seminaftofluoresceína	C-SNAFL-1	7,8	510

Tabla 4.2.3. Lista de abreviaturas y nombres de las sondas sensibles al pH evaluadas

La primera de las opciones consideradas fue la fluoresceína, por tratarse de un compuesto conocido, con numerosas aplicaciones y ampliamente estudiado en la literatura. Förster y Lindqvist, entre otros, [6,54] publicaron amplios estudios sobre las diferentes formas prototrópicas de la fluoresceína y sobre los cambios en sus propiedades con la variación del pH. Se prepararon varias disoluciones de fluoresceína, a distintas concentraciones y valores de pH, tanto para medidas de absorción como para la medida de tiempos de vida. Asimismo, se utilizó la fluoresceína para establecer un protocolo de valoración espectrofotométrica. De esta forma, podemos calcular el valor del pK_a (en el estado fundamental) de cualquier sonda. Si bien es cierto que el método descrito en este trabajo (ver el apartado 3.2.4 y el apéndice A.3 para una descripción completa) está basado en medidas de absorbancia, podría proponerse un método similar para las medidas estacionarias de emisión de fluorescencia.

La gráfica 4.2.3 representa los valores de absorbancia (corregida con la concentración) de una muestra de fluoresceína (4,57 μM), en una disolución ácida H₂O/HCl (pH₀~1; T=25,4 °C), a la que se fueron añadiendo progresivamente volúmenes de H₂O/NaOH (pH₀~12; T=25,4 °C). En determinados puntos de la valoración se extraían 3ml y se pipeteaban en una cubeta para medir su absorbancia a tres longitudes de onda. Después de la medida, se devolvía a la disolución original, se comprobaba que no había cambios en el pH y se continuaba la valoración. Las medidas, recogidas en la tabla 4.2.4, muestran los valores corregidos de absorbancia, en función del volumen de H₂O/NaOH añadido.

Las medidas se hicieron exclusivamente a tres longitudes de onda características: 437nm (●), corresponde con el máximo de absorción de la forma catiónica de la fluoresceína; 464nm (△), es el punto medio entre los dos máximos de absorción de la forma aniónica de la fluoresceína; 491nm (■) corresponde al máximo de absorción de la forma totalmente deprotonada de la fluoresceína (dianión). Los puntos de inflexión de cada una de las curvas revelan el valor de la constante de disociación ácida de la sonda (pK_a).

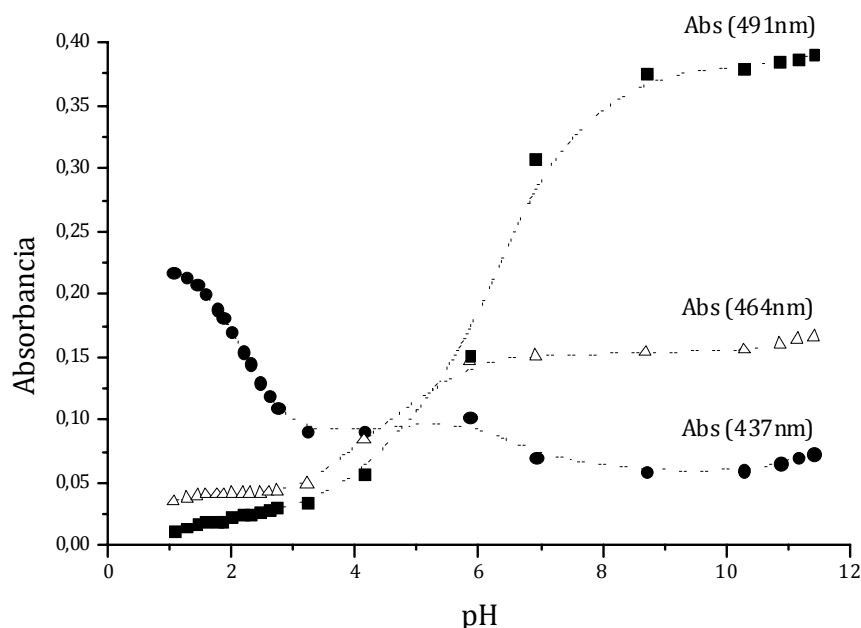


Figura 4.2.3. Curvas de valoración espectrofotométrica de una muestra de fluoresceína (4,57 μ M) a tres longitudes de onda características.

NaOH (ml)	pH	T (°C)	A(437nm)	A(464nm)	A(491nm)
0	1,06	25,4	0,2174	0,0349	0,0111
3,00	1,27	25,4	0,2140	0,0377	0,0145
4,50	1,44	25,3	0,2082	0,0391	0,0167
5,50	1,58	25,2	0,2004	0,0405	0,0187
6,55	1,76	25,2	0,1880	0,0404	0,0190
7,05	1,86	25,2	0,1815	0,0407	0,0201
7,50	2,00	25,2	0,1702	0,0413	0,0227
8,00	2,18	25,1	0,1544	0,0420	0,0249
8,20	2,29	25,1	0,1446	0,0419	0,0251
8,45	2,46	25,0	0,1296	0,0420	0,0271
8,60	2,60	24,9	0,1189	0,0428	0,0284
8,75	2,74	24,9	0,1101	0,0437	0,0302
8,90	3,22	24,9	0,0914	0,0490	0,0348
9,00	4,14	24,9	0,0914	0,0843	0,0574
9,05	5,85	24,8	0,1020	0,1476	0,1519
9,10	6,92	24,8	0,0704	0,1507	0,3074
9,15	8,70	24,8	0,0590	0,1539	0,3761
9,25	10,29	24,8	0,0599	0,1552	0,3803
9,45	10,87	24,8	0,0655	0,1602	0,3854
9,60	11,15	24,8	0,0700	0,1643	0,3867
9,90	11,41	24,8	0,0728	0,1662	0,3904

Tabla 4.2.4. Valores corregidos de absorbancia de la fluoresceína (4,57 μ M) durante la valoración HCl/NaOH

Como se hizo notar en el apartado 2.4, es posible detectar un cambio en el tiempo de vida de una sonda fluorescente cuando nos encontramos en el rango de pH en el que la sonda puede ser excitada tanto en su zona protonada como deprotonada, siempre que la luz incidente tenga la energía apropiada para excitar cualquiera de las dos especies.

Sin embargo, en nuestro caso, con la fuente PLS 8-3-218 ($\lambda_{\text{ex,max}}=486\text{nm}$), la especie excitada preferentemente es la forma dianiónica de la fluoresceína, con lo que no es posible inducir reacciones de transferencia de carga en estado excitado en la fluoresceína. Esto se observa en los decaimientos de varias muestras de fluoresceína ($3\mu\text{M}$), donde por debajo de $\text{pH}=7$ no era posible obtener un decaimiento con altos conteos, ya que la forma aniónica no se excita fácilmente, sino por debajo de 480nm , que se encuentra fuera del rango de la fuente PLS.

N°	pH	Ajuste monoexponencial		Ajuste biexponencial				
		τ (ns)	χ^2_{R}	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	α_1	α_2	χ^2_{R}
1	5,70	$4,01\pm 0,02$	1,112					
2	6,34	$3,97\pm 0,02$	1,052					
3	6,75	$4,01\pm 0,02$	1,055					
4	7,47	$4,10\pm 0,02$	1,093					
5	7,53	$4,01\pm 0,02$	1,092	$3,92\pm 0,02$	13 ± 2	0,991	0,009	1,131
6	7,72	$4,02\pm 0,02$	1,094	$3,89\pm 0,02$	$9,9\pm 0,8$	0,983	0,017	1,038
7	8,37	$4,03\pm 0,02$	1,030	$3,95\pm 0,02$	14 ± 2	0,992	0,008	1,026
8	9,23	$4,05\pm 0,02$	1,075	$3,98\pm 0,02$	10 ± 2	0,992	0,008	1,070
9	10,74	$4,05\pm 0,02$	1,076	$4,00\pm 0,02$	7 ± 1	0,989	0,011	1,071
10	11,63	$4,06\pm 0,02$	1,099	$3,97\pm 0,02$	9 ± 1	0,988	0,012	0,995
Promedio (ns)		$4,03\pm 0,02$		$3,95\pm 0,02$				

Tabla 4.2.5. Tiempos de vida de la fluoresceína ($3\mu\text{M}$) a diferentes valores de pH.

En cualquiera de los casos, la contribución del segundo tiempo de vida está en torno al 1%, lo que hace más plausible considerar que el modo de decaimiento más probable de la fluoresceína, excitada a 486nm , sea el de un único tiempo de vida con un valor próximo a 4ns .

4.2.3. Caracterización del C-SNARF-1 como sonda sensible al pH

Basándonos en los mismos criterios, estudiamos la posibilidad de utilizar la sonda C-SNARF-1 (Invitrogen Inc.) como alternativa para proseguir con nuestro estudio. Por

tanto, el primer paso fue obtener sus espectros de absorción y de emisión a diferentes valores de pH.

Nº	pH	T (°C)	C (μM)
1	3,13	22,6	2,16
2	3,88	22,8	2,17
3	4,64	23,1	2,19
4	5,24	22,8	2,48
5	7,10	24,1	2,12
6	8,97	22,3	2,07
7	9,89	23,4	2,21
8	11,08	23,3	2,38
9	11,92	22,5	2,12
10	12,83	22,3	2,21

Tabla 4.2.6. Valores de concentración y pH de las muestras preparadas para las medidas de absorción y emisión de fluorescencia

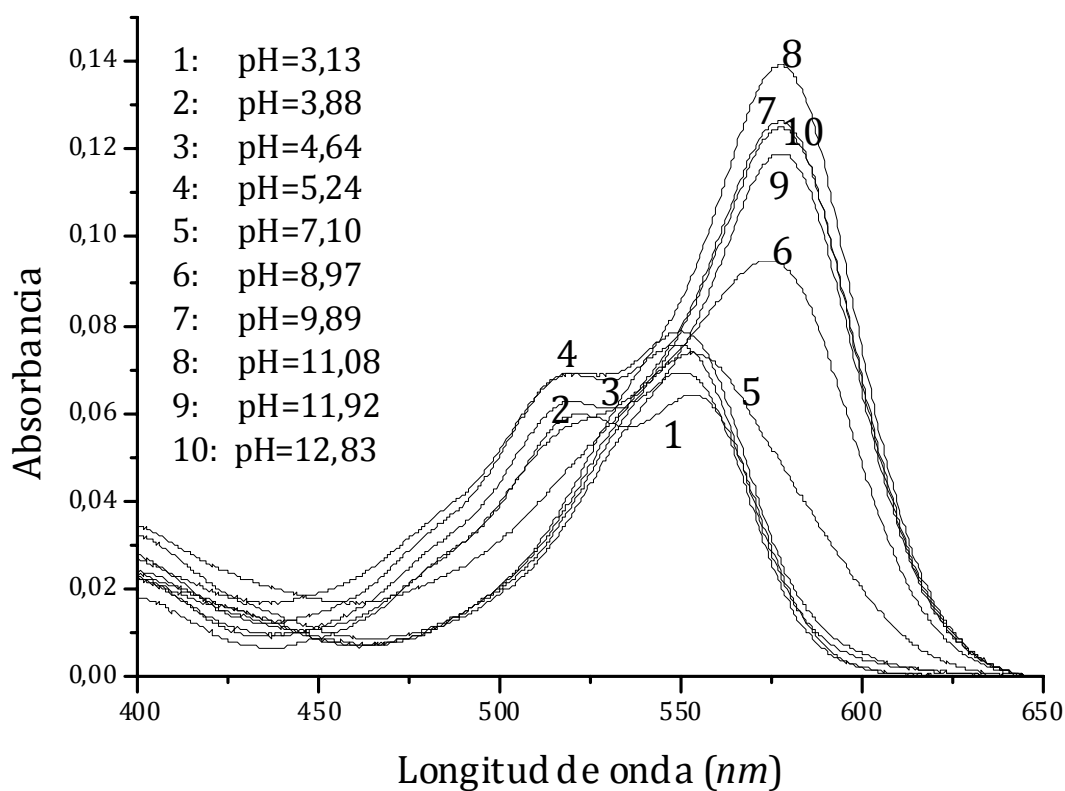


Figura 4.2.4. Espectros de absorción del C-SNARF-1 en función del pH

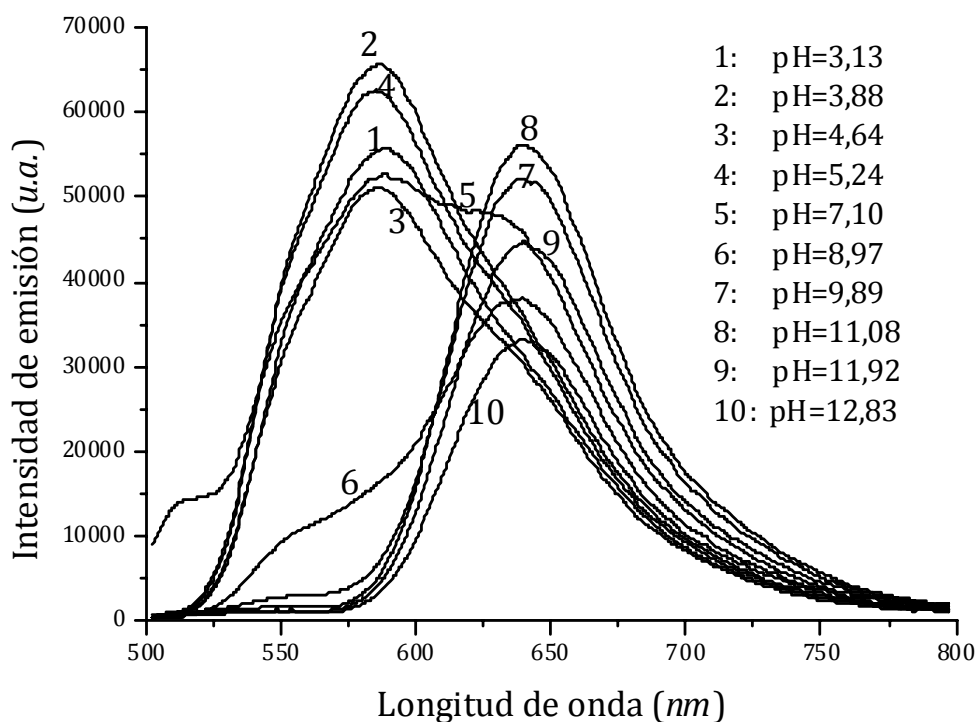


Figura 4.2.5. Espectros de emisión de fluorescencia del C-SNARF-1 en función del pH

Todos los espectros de absorción han sido dados en unidades de absorbancia, pero la absorbancia depende de la concentración de la muestra. Por tanto, sería deseable poder expresar los valores de absorción de la sonda en términos de su coeficiente de extinción molar. Para ello, sería preciso preparar para cada valor de pH una serie de al menos cuatro o cinco concentraciones distintas, a partir de las cuales efectuar una recta de calibrado. Como eso supone la preparación de una gran cantidad de muestras, decidimos restringir estos cálculos a cuatro disoluciones de diferente concentración en torno a un pH~7.

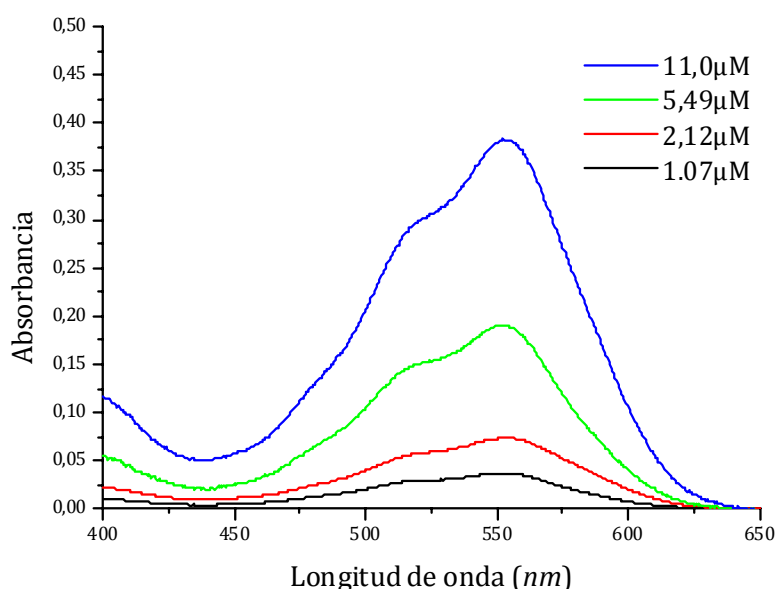


Figura 4.2.6. Espectros de absorción de la sonda C-SNARF a distintas concentraciones

	$C_{SNARF} (\mu M)$	pH	T (°C)
SNARF-01	1,07	6,89	22,9
SNARF-02	2,12	6,84	22,8
SNARF-05	5,49	6,92	22,8
SNARF-10	11,00	6,93	22,9

Tabla 4.2.7. Concentración, pH y temperatura de las muestras de calibrado de la sonda

Dentro de la caracterización fotofísica de la sonda, una de las propiedades que se deseaba determinar era el rendimiento cuántico, ya que en medidas preliminares se observó que, a pesar de la fuerte coloración de algunas muestras, el número de cuentas por segundo recogidas en las medidas de fluorescencia hacían pensar que se trata de una sonda de bajo rendimiento cuántico.

Para determinar el rendimiento cuántico, se empleó el método descrito en el apartado 3.2.2.3, comparando los espectros de absorción y emisión de la sonda con un estándar de referencia.

Compuesto	Disolvente	$\lambda_{exc}(nm)$	$\lambda_{em}(nm)$	Φ
Sulfato de quinina	0,1M H ₂ SO ₄	350	400-600	0,54
β -carbolina	1N H ₂ SO ₄	350	400-500	0,60
Fluoresceína	0,1M NaOH	496	500-600	0,95
9,10-DPA	Ciclohexano	366	400-500	1,00
2-aminopiridina	0,1N H ₂ SO ₄	285	315-480	0,60
Triptófano	Agua	280	300-380	0,13
Rhodamina 6G	Etanol	488	520-620	0,94
	Agua	488	520-620	0,95‡
Rhodamina 101	Etanol	450	600-650	1,00
Violeta de cresilo	Metanol	540	600-650	0,54

Tabla 4.2.8. Compuestos utilizados como estándar de referencia de rendimientos cuánticos. Tomado de: J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2nd ed., Kluwer/Plenum Press, New York, 1999.

(‡) D. Magde, G.E. Rojas, P. Seybold, *Photochem. Photobiol.* 70, 737, 1999.

De todas las sustancias propuestas como estándar de referencia para el rendimiento cuántico (ver tabla 4.2.8), elegimos la Rhodamina 6G (en agua), por la longitud de onda de excitación, coincidente con el máximo de emisión de la fuente PLS. Para determinar el rendimiento cuántico, se prepararon tres disoluciones: una disolución de Rhodamina 6G en agua (pH=7; 4 μ M), una disolución de C-SNARF-1 (H₂O/HCl, pH=6; 4 μ M) y una disolución de C-SNARF-1 (H₂O/NaOH, pH=10; 4 μ M).

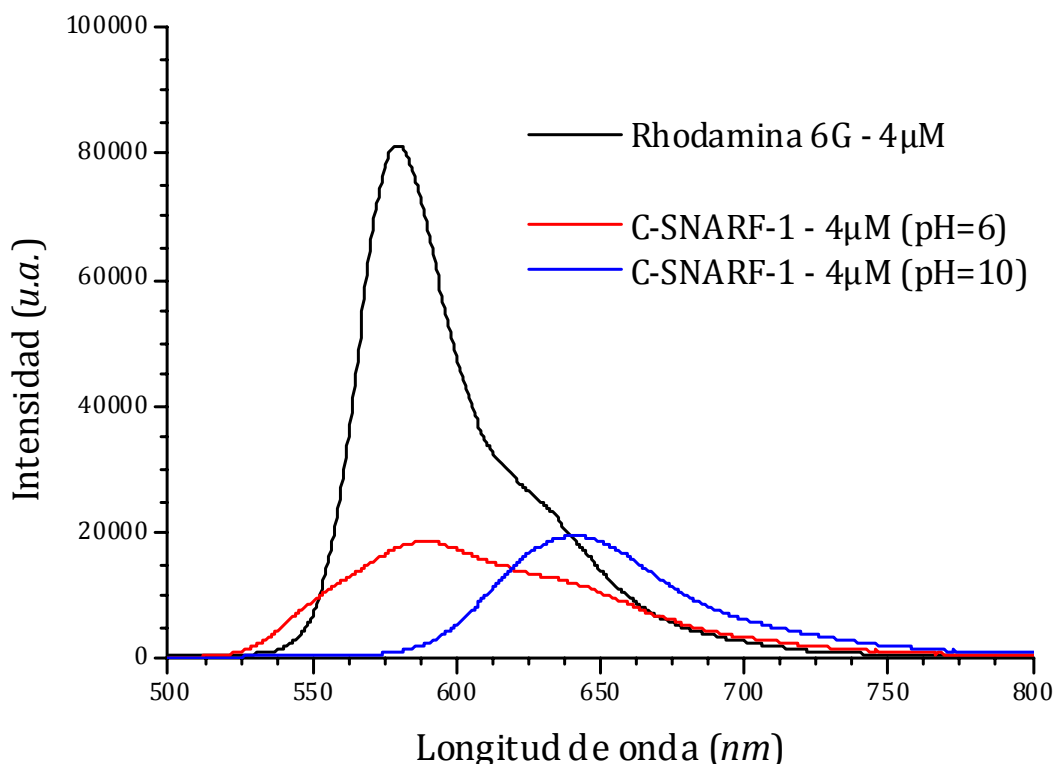


Figura 4.2.7. Espectros de emisión de fluorescencia de la Rhodamina 6G y de C-SNARF-1

Como el tipo de medidas elegidas para este trabajo consiste, fundamentalmente, en el estudio del tiempo de vida de fluorescencia de las sondas, quisimos determinar la concentración óptima de las muestras en disolución, atendiendo al número de cuentas por segundo que se registran durante la medida del decaimiento. La tabla 4.2.9 muestra los resultados aproximados para muestras de C-SNARF-1 de diferentes concentraciones, excitadas a 486nm con la fuente PLS-8-3-218, a una frecuencia de repetición de 20MHz. La longitud de onda de emisión seleccionada para el detector fue de 585nm.

<i>Muestra</i>	<i>pH /</i>	<i>T (°C)</i>	<i>Conteo (cps)</i>	<i>Tiempo de medida (min)</i>
cps0 (20μM)	7,41	23,4	900	15
cps1 (16μM)	7,70	24,7	600	30
cps2 (12μM)	7,80	24,9	700	25
cps3 (8μM)	7,97	25,0	700	40

Tabla 4.2.9. Conteo registrado en el decaimiento de varias muestras de C-SNARF-1.

Si la concentración es demasiado baja, el número de cuentas por segundo decae bruscamente, lo que va en detrimento de las posibilidades del método de resolución temporal. En cambio, la concentración no puede exceder el valor de la disolución madre

(22,05 μ M), que es la máxima que podemos conseguir con un vial de 1mg de C-SNARF-1. Finalmente, optamos por una solución intermedia, preparando disoluciones a diferentes valores de pH con concentraciones próximas a 14 μ M. Dado que la intensidad de emisión también cambia con el pH, algunas disoluciones dieron conteos superiores a los indicados en la tabla anterior.

Finalmente, para concluir la caracterización de la sonda C-SNARF-1, se realizó una valoración espectrofotométrica de la sonda, siguiendo el mismo protocolo aplicado a la fluoresceína, pero utilizando cuatro longitudes de onda: los máximos de la forma protonada, correspondientes a 520nm (**A**) y 550nm (**C**); el máximo de la forma deprotonada a 577nm (**D**) y un punto pseudo-isosbéstico a 535nm (**B**). La concentración de la disolución inicial era 3,28 μ M.

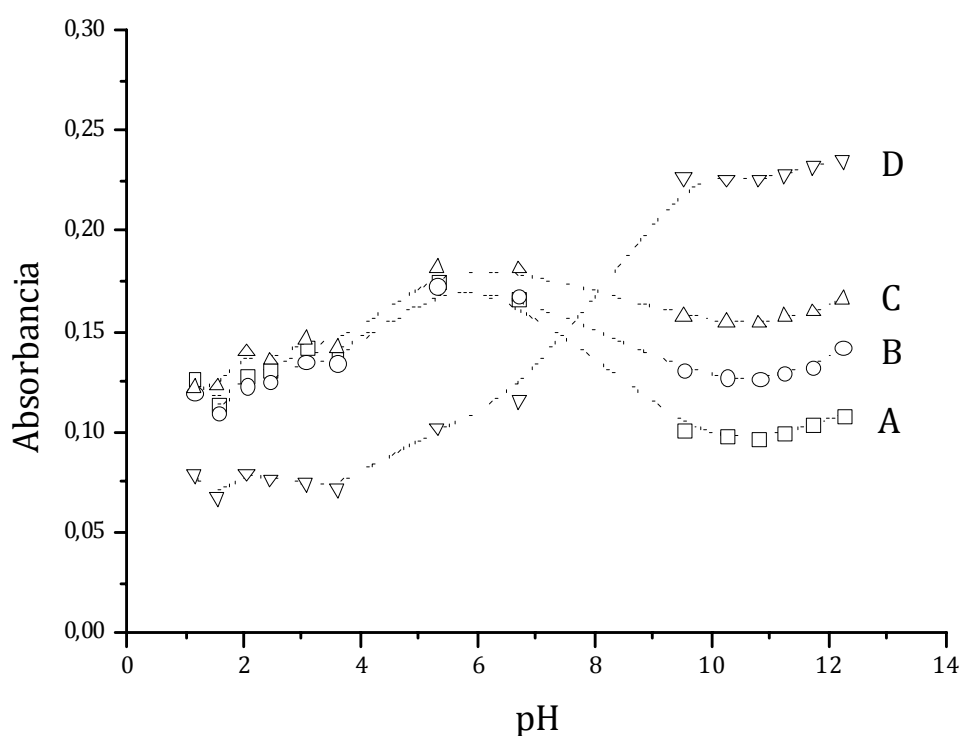


Figura 4.2.8. Curvas de valoración espectrofotométrica del C-SNARF-1

NaOH (ml)	pH	T (°C)	A(520nm)	A(535nm)	A(550nm)	A(577nm)
0	1,15	22,8	0,1270	0,1200	0,1220	0,0790
3,00	1,55	23,7	0,1140	0,1097	0,1226	0,0678
4,50	2,05	23,8	0,1281	0,1232	0,1398	0,0799
5,50	2,45	23,8	0,1304	0,1251	0,1356	0,0765
6,55	3,06	23,7	0,1426	0,1355	0,1462	0,0749
7,05	3,59	23,7	0,1363	0,1345	0,1417	0,0717
7,50	5,30	23,7	0,1747	0,1729	0,1819	0,1026
8,00	6,70	23,7	0,1664	0,1682	0,1808	0,1157
8,20	9,52	23,7	0,1017	0,1307	0,1580	0,2269
8,45	10,25	23,7	0,0984	0,1276	0,1550	0,2260
8,60	10,80	23,7	0,0972	0,1265	0,1541	0,2256
8,75	11,24	23,6	0,1002	0,1299	0,1578	0,2283
8,90	11,72	23,6	0,1038	0,1327	0,1596	0,2326
9,00	12,23	23,7	0,1087	0,1419	0,1663	0,2351

Tabla 4.2.10. Valores corregidos de absorbancia del C-SNARF-1 (4,57 μ M) durante la valoración HCl/NaOH

4.3. Medidas con resolución temporal para sondas sensibles al pH

Después de la caracterización básica de las sondas, a través de sus espectros de absorción y de emisión, se preparó una nueva serie de muestras con diferentes valores de pH para obtener sus decaimientos. La concentración de sonda en las disoluciones se ajustó próxima a 14 μ M, para poder obtener un conteo razonable a 20MHz, tal como se indicó en el apartado 4.2.3. La tabla 3.4.1 muestra los resultados de los decaimientos. Se comenzó ajustando a un modelo monoexponencial y cuando los residuos y su autocorrelación mostraban un ajuste insatisfactorio, se procedía a ajustar a un modelo biexponencial. Debido a que la emisión de la sonda es bastante deficiente a 585nm para bajos valores de pH, se optó por registrar el decaimiento a 560nm y 575nm para otras muestras.

Muestra	pH	T (°C)	τ_1 (ns)	α_1	τ_2 (ns)	α_2	χ^2	λ_{em} (nm)
SPH04	4,49	23,0	4,15	0,2937	0,50	0,7063	1,159	560
SPH05	5,07	23,0	3,98	0,4724	0,57	0,5276	1,095	560
SPH06	5,90	22,3	4,15	0,3210	0,55	0,6790	1,121	560
SPH07	6,90	22,3	4,10	0,1378	0,59	0,8622	1,291	575
SPH08	7,70	23,0	4,12	0,1019	0,57	0,8981	1,218	585
SPH88	8,03	23,5	3,83	0,1033	0,53	0,8967	1,142	585
SPH09	8,90	23,5	3,90	0,0751	0,53	0,9249	1,117	585
SPH10	10,25	23,0	1,44	1	-	-	1,073	585
SPH11	11,25	23,5	1,44	1	-	-	0,946	585
SPH12	11,65	22,5	1,44	1	-	-	1,101	585

Tabla 4.3.1. Valores de los parámetros para los ajustes exponenciales de los decaimientos

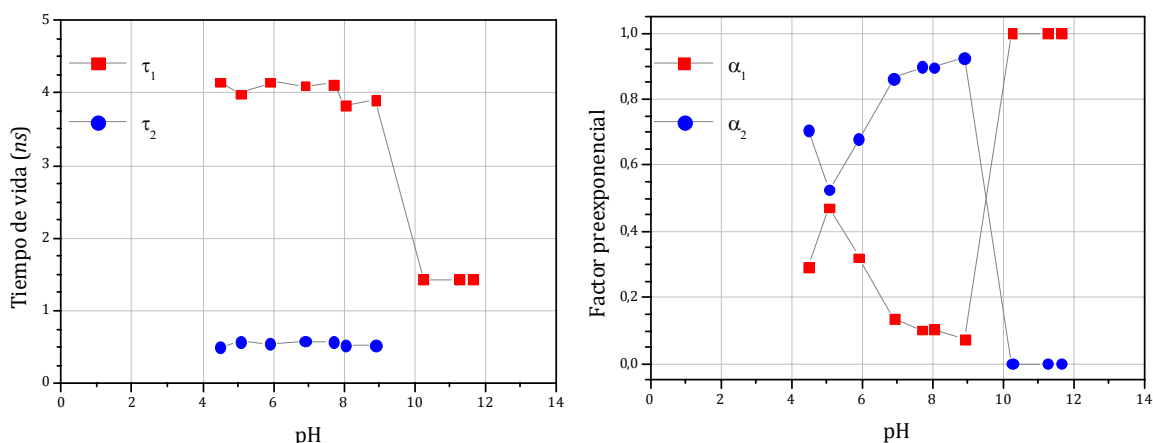


Figura 4.3.1. Representación gráfica de los tiempos de vida y factores preexponenciales calculados para el ajuste biexponencial de decaimiento para la sonda C-SNARF-1

Como el aumento de pH provoca un desplazamiento batocrómico de la emisión de la sonda fluorescente, la medida de decaimientos a mayores longitudes de onda (cuando el pH es típicamente alcalino) permite obtener medidas con más resolución en menos tiempo. Por ese motivo, se repitieron los decaimientos de las muestras con pH más elevado, hasta una longitud de onda de 620nm. La tabla 4.3.2 muestra dichos valores.

Muestra	pH	T (°C)	τ_1 (ns)	α_1	τ_2 (ns)	α_2	χ^2	λ_{em} (nm)
SPH88	8,03	23,5	2,89	0,1207	0,61	0,8793	1,120	620
SPH09	8,90	23,5	2,67	0,2012	0,62	0,7988	1,077	620
SPH10	10,25	23,0	1,41	1	-	-	1,223	620
SPH11	11,25	23,5	1,43	1	-	-	1,273	620
SPH12	11,65	22,5	1,41	1	-	-	1,150	620

Tabla 3.4.2. Valores de los parámetros para los ajustes exponenciales de los decaimientos a una longitud de onda distinta (620nm).

Se calcularon para todos los ajustes anteriores los tiempos de vida promedio, de acuerdo con la definición dada en el Apéndice A.6.2, mostrándose a continuación los resultados.

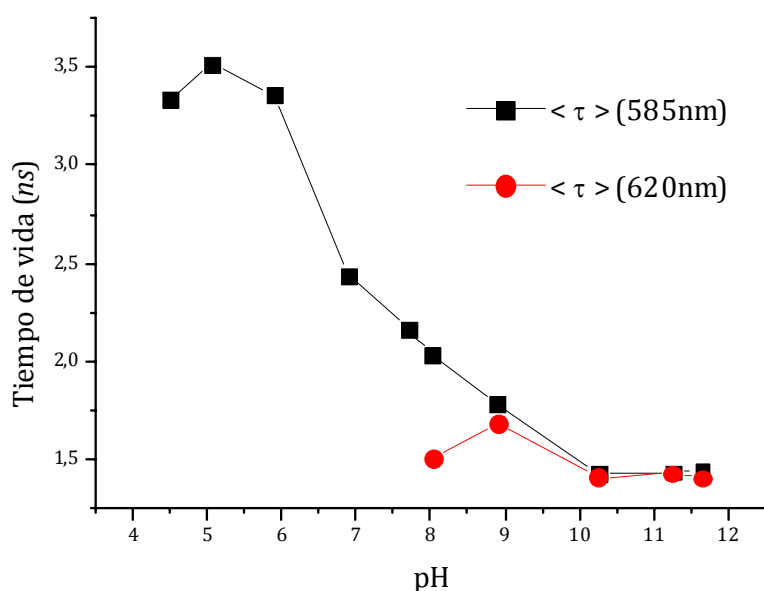


Figura 4.3.2. Tiempos de vida promedio de la sonda C-SNARF-1 en función del pH y a partir de los decaimientos obtenidos a dos longitudes de onda

4.4. Hinchamiento de geles

4.4.1. Medidas preliminares

Con las muestras recibidas de PVI40(2), se procedió a cortar los discos liofilizados en fragmentos de menor peso, de modo que, una vez hinchados, los pudiéramos introducir en la cubeta de metacrilato especialmente preparada (ver apartado 3.1.4). Además, debido al elevado precio de la sonda C-SNARF-1, se intentaron preparar disoluciones poco concentradas y con poco volumen. El peso ideal (en seco) no debería ser superior a los 30mg. Aunque también se prepararon muestras de mayor peso y una vez hinchados los geles, se cortaron en trozos que podían introducirse en la cubeta.

Una vez seleccionados los trozos de hidrogel, se procedió a preparar disoluciones a distintos valores de pH y con cantidades variables de sonda fluorescente, de forma que pudiéramos mantener constante la concentración efectiva de gel (ver tabla 3.3.1).

En primer lugar, se prepararon unas muestras preliminares para observar el comportamiento del hidrogel y su interacción con la sonda fluorescente. Una muestra GREF fue hinchada en ausencia de sonda, mientras que las muestras GL y GH se prepararon con una concentración de 2 μ M y 14 μ M, respectivamente. Todas estas muestras fueron hinchadas en disoluciones con un pH~4. Después, se añadió la muestra

GA, de las mismas características que GL, pero fue preparada a un pH bastante más ácido (pH~2,5).

Posteriormente, tras observar el comportamiento de estas muestras, se decidió preparar cinco muestras más con trozos mayores de gel, utilizando concentraciones de sonda fluorescente próximas a 3 μ M y estableciendo el pH inicial en un rango entre 2 y 3. En la tabla 4.4.1 se muestra el peso de los trozos de hidrogel seco y las condiciones iniciales de la disolución, así como el valor calculado de concentración efectiva de gel.

	<i>Gel seco</i>	<i>Sonda C-SNARF-1</i>			<i>Concentración efectiva</i>
	<i>Peso (mg)</i>	<i>Concentración (μM)</i>	<i>pH_i</i>	<i>T_i (°C)</i>	<i>de gel ($\times 10^{-2}$ M)</i>
REF	25,5	---	3,78	25,0	9,75 \pm 0,04
GL	19,6	2,15	4,25	23,7	9,78 \pm 0,05
GH	11,2	14,05	3,90	24,7	9,77 \pm 0,09
GA	19,6	2,11	2,51	24,3	9,80 \pm 0,05
G1-23	44,6	2,84	2,27	23,4	9,75 \pm 0,04
G2-32	44,0	2,84	3,19	23,7	9,77 \pm 0,04
G3-27	50,6	2,46	2,73	23,7	9,79 \pm 0,04
G4-24	78,0	3,59	2,40	23,8	9,79 \pm 0,03
G5-26	55,0	2,95	2,61	23,5	9,70 \pm 0,04

Tabla 4.4.1. Condiciones iniciales de la muestras para el hinchamiento de hidrogeles

Una vez preparadas las muestras y medidas las condiciones iniciales, es preciso esperar a que se alcance el equilibrio para poder medir el grado de hinchamiento. Para garantizar que todas las muestras fueran manipuladas una vez se alcanzara el equilibrio, se midió el pH y la temperatura de la disolución sobrenadante a lo largo de varios días, alcanzándose medidas con mínimas fluctuaciones en un período inferior a tres semanas (20 días para las muestras preliminares y 18 días para las demás).

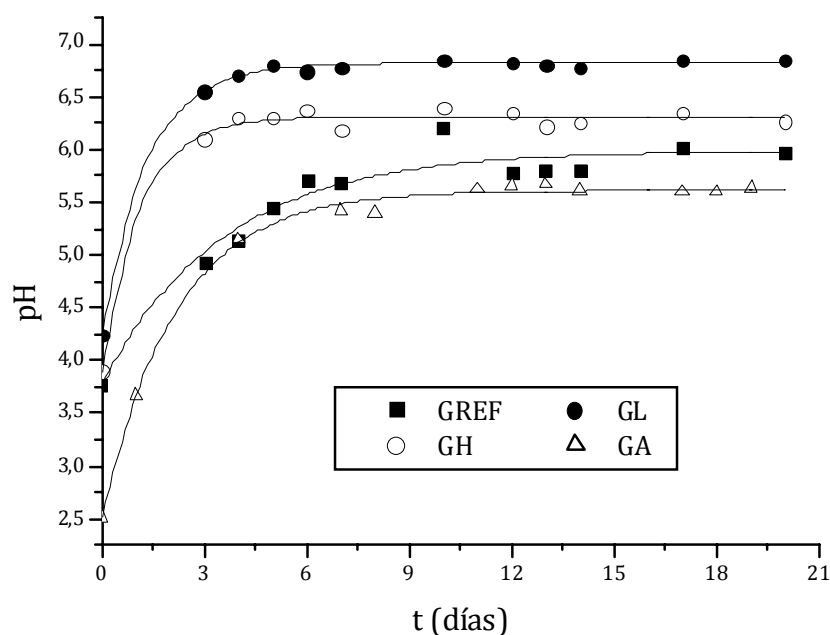


Figura 4.4.1. Evolución del pH de las muestras preliminares con el tiempo

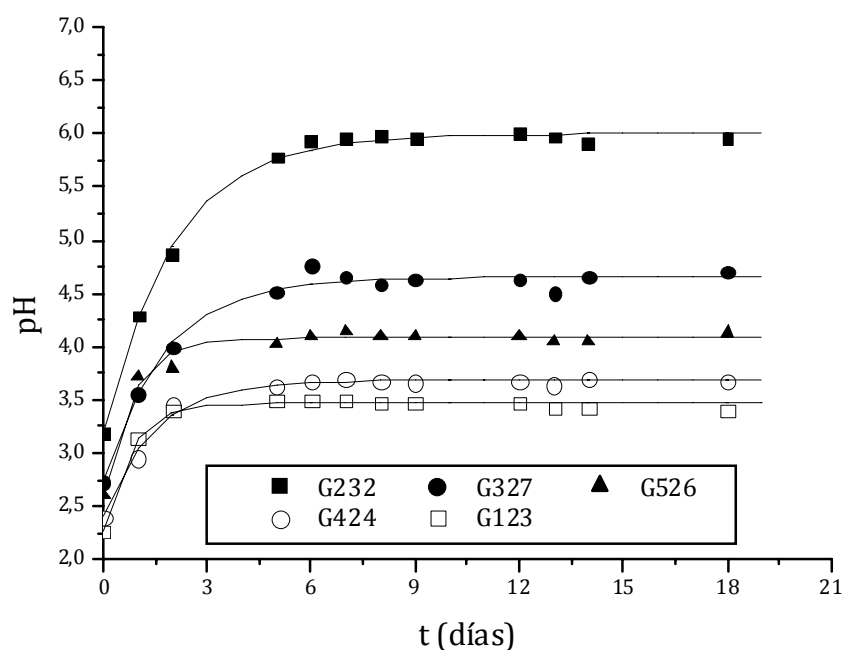


Figura 4.4.2. Evolución del pH de las muestras definitivas con el tiempo

En las figuras precedentes, los valores puntuales representan las medidas experimentales, mientras que las líneas continuas son los ajustes exponenciales de la variación temporal del pH de la disolución sobrenadante. A la vista de las gráficas, existen dos formas de calcular el pH de la disolución sobrenadante en el equilibrio de hinchamiento (pH_s). La primera de ellas consiste en calcular el promedio del valor del pH a partir de la segunda semana. La segunda consiste en determinar el pH de equilibrio a

partir del valor asintótico del ajuste exponencial de los datos. La tabla 4.4.2 muestra los resultados de ambos métodos.

	pH_i	T_i (°C)	pH_s (promedio)	pH_s (ajuste)
REF	3,78	25,0	5,93	5,98
GL	4,25	23,7	6,82	6,82
GH	3,90	24,7	6,31	6,31
GA	2,51	24,3	5,63	5,61
G1-23	2,27	23,4	3,45	3,47
G2-32	3,19	23,7	5,96	6,00
G3-27	2,73	23,7	4,62	4,65
G4-24	2,40	23,8	3,67	3,68
G5-26	2,61	23,5	4,09	4,08

Tabla 4.4.2. Valores de pH de equilibrio (pH_s) para la disolución sobrenadante

Todos los valores de pH, a lo largo del tiempo, fueron medidos junto con la temperatura de la disolución. No se ha efectuado ninguna corrección de los valores de pH por las desviaciones de la temperatura, por considerar que éstas son inferiores a la incertidumbre de las medidas. En la figura 4.4.3 se observa la variación del pH del agua *pura* (destilada y desionizada) con la temperatura [13-15].

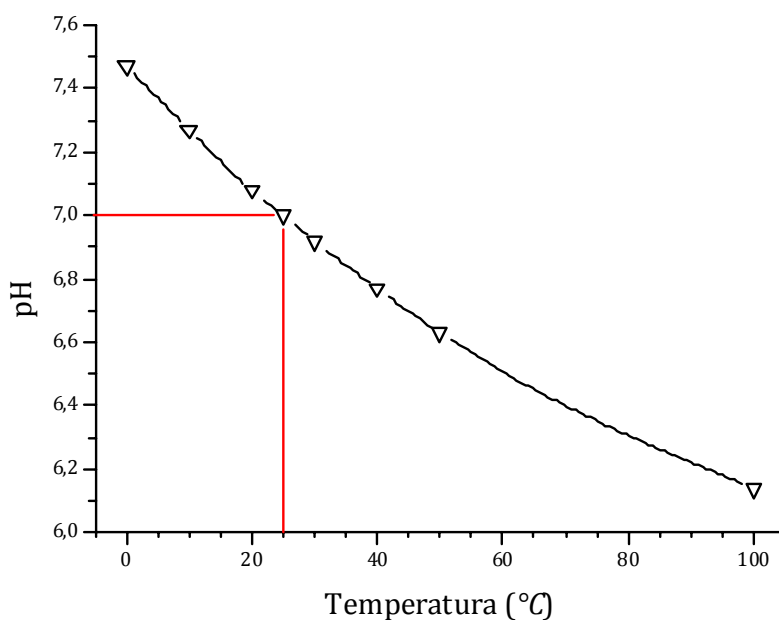


Figura 4.4.3. Variación del pH *neutro* con la temperatura por la variación de K_w .

4.4.2. Grado de hinchamiento

Una vez alcanzado el equilibrio, se estableció el grado de hinchamiento a través de medidas individuales del aumento relativo de peso del hidrogel. Uno a uno fueron extrayéndose los geles de la disolución y después de retirar el exceso de agua en contacto con papel de filtro, se pesaron los geles hinchados. Inmediatamente después de cada pesada se volvía a introducir el gel en su correspondiente disolución. El peso del gel hinchado, así como el grado de hinchamiento (calculado como aumento relativo de peso) se muestran en la tabla 4.4.3. En la figura 4.4.3 se representan los valores del grado de hinchamiento calculados en función del pH inicial de la disolución.

	m_0 (mg)	m_h (mg)	pH_i	T_i (°C)	S (g_{hinc}/g_{seco})
GREF	25,5	239,6	3,78	25,0	9,40±0,04
GL	19,6	122,5	4,25	23,7	6,25±0,04
GH	11,2	79,5	3,90	24,7	7,10±0,07
GA	19,6	276,8	2,51	24,3	14,12±0,08
G1-23	44,6	756,9	2,27	23,4	16,97±0,04
G2-32	44,0	441,5	3,19	23,7	10,03±0,03
G3-27	50,6	691	2,73	23,7	13,66±0,03
G4-24	78,0	1291,6	2,40	23,8	16,56±0,02
G5-26	55,0	844	2,61	23,5	15,35±0,03

Tabla 4.4.3. Grado de hinchamiento de los hidrogeles PVI40(2)

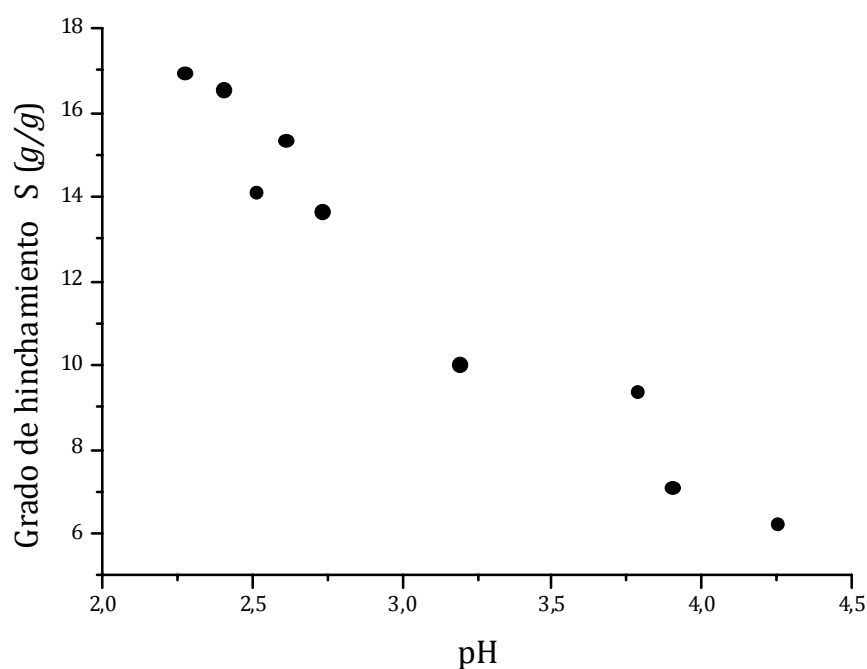


Figura 4.4.3. Grado de hinchamiento de hidrogeles PVI40(2) en función del pH inicial

4.4.3. Medidas de tiempo de vida de fluorescencia en hidrogeles

A partir de las muestras de hidrogeles preparadas para medir el grado de hinchamiento, se pudieron medir los decaimientos de la sonda fluorescente C-SNARF-1 contenida en la fase líquida de los geles hinchados. Todas las muestras (a excepción de GREF, cuya disolución inicial no contenía la sonda) fueron introducidas en la cubeta de metacrilato a un ángulo de 45° con respecto al eje de excitación. Esta disposición aumentaba ligeramente el conteo, unido al efecto de dispersión creado por el gel. La tabla 4.4.4 recoge los parámetros significativos del ajuste exponencial de los decaimientos obtenidos.

	pH _i	λ_{em} (nm)	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	α_1	α_2	χ^2_R
G1-23	2,27	585	2,8767	0,5272	0,2659	0,7341	1,3690
G4-24	2,40	585	2,7769	0,5528	0,2132	0,7868	1,0572
GA	2,51	585	2,4829	0,4957	0,1576	0,8424	1,0141
G5-26	2,61	585	2,3837	0,4956	0,2004	0,7996	1,0708
G3-27	2,73	620	2,1401	0,47204	0,3825	0,6175	1,0521
G2-32	3,19	635	2,1806	0,538	0,7423	0,2577	1,0808
GH	3,90	650	2,1385	---	1	0	1,0593
GL	4,25	650	2,3589	---	1	0	1,1873

Tabla 4.4.4. Parámetros calculados a partir de los decaimientos medidos en los hidrogeles

Estos mismos resultados se pueden representar gráficamente para observar sus variaciones en función del pH inicial de la disolución en la que se hincharon los geles. En la tabla 4.4.1 se encuentran resumidas dichas condiciones.

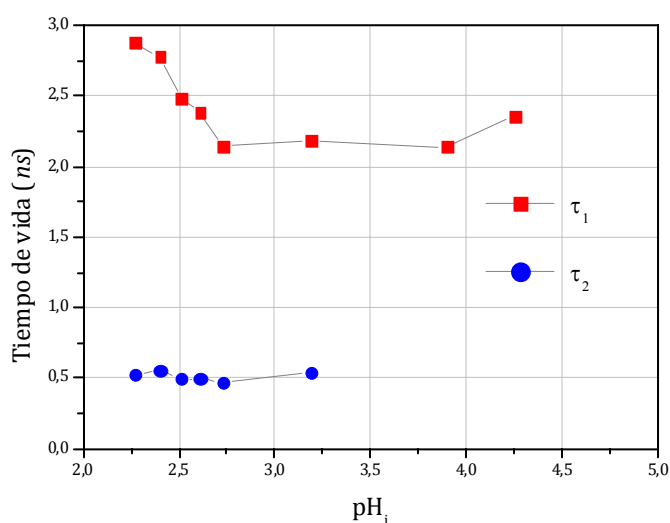


Figura 4.4.4. Tiempos de vida de la sonda C-SNARF-1 en el interior de los hidrogeles

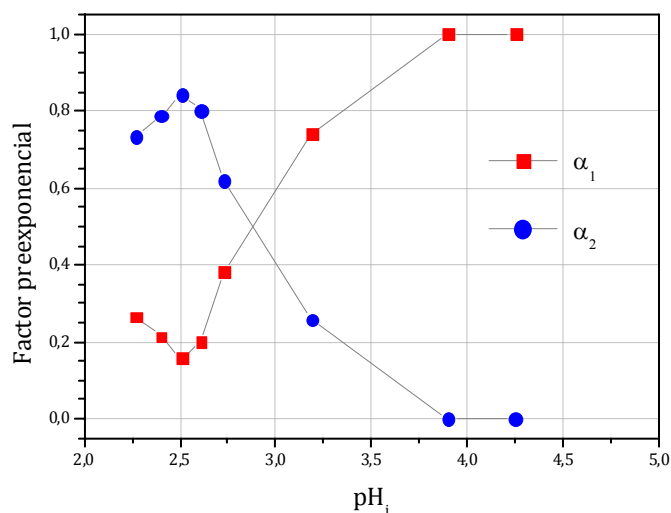


Figura 4.4.5. Factores preexponenciales de los decaimientos medidos en hidrogeles.

4.4.4. Cambios en la concentración de sonda en el sobrenadante

Durante las medidas preliminares se observó que los geles, una vez sumergidos en la disolución, comienzan paulatinamente a hincharse, a la vez que empiezan a adquirir el color característico de la sonda. Al cabo de unos días (a medida que el pH va aumentando), el color del gel podía variar del rosado al violáceo oscuro, coincidiendo con el viraje de la sonda. Pero además pudo constatar, al cabo de unos días, que la intensidad del color iba en aumento, mientras que la intensidad aparente de color de la disolución sobrenadante disminuía.

Por ese motivo, se decidió medir el espectro de absorción del sobrenadante y compararlo con el espectro de absorción de una disolución equivalente a la disolución inicial. La figura 4.4.6 muestra los espectros de absorción de las disoluciones sobrenadantes. La comparativa entre los dos conjuntos de disoluciones se muestra en los diversos paneles de la figura 4.4.7.

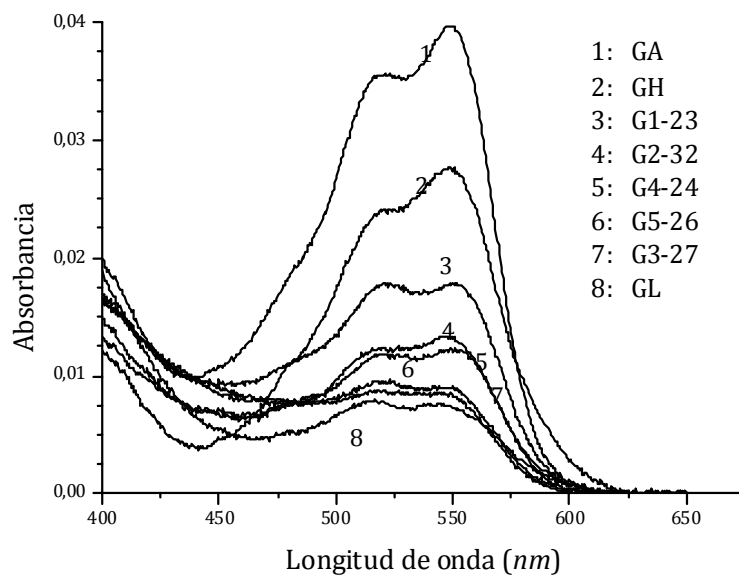


Figura 4.4.6. Espectros de absorción de las disoluciones sobrenadantes

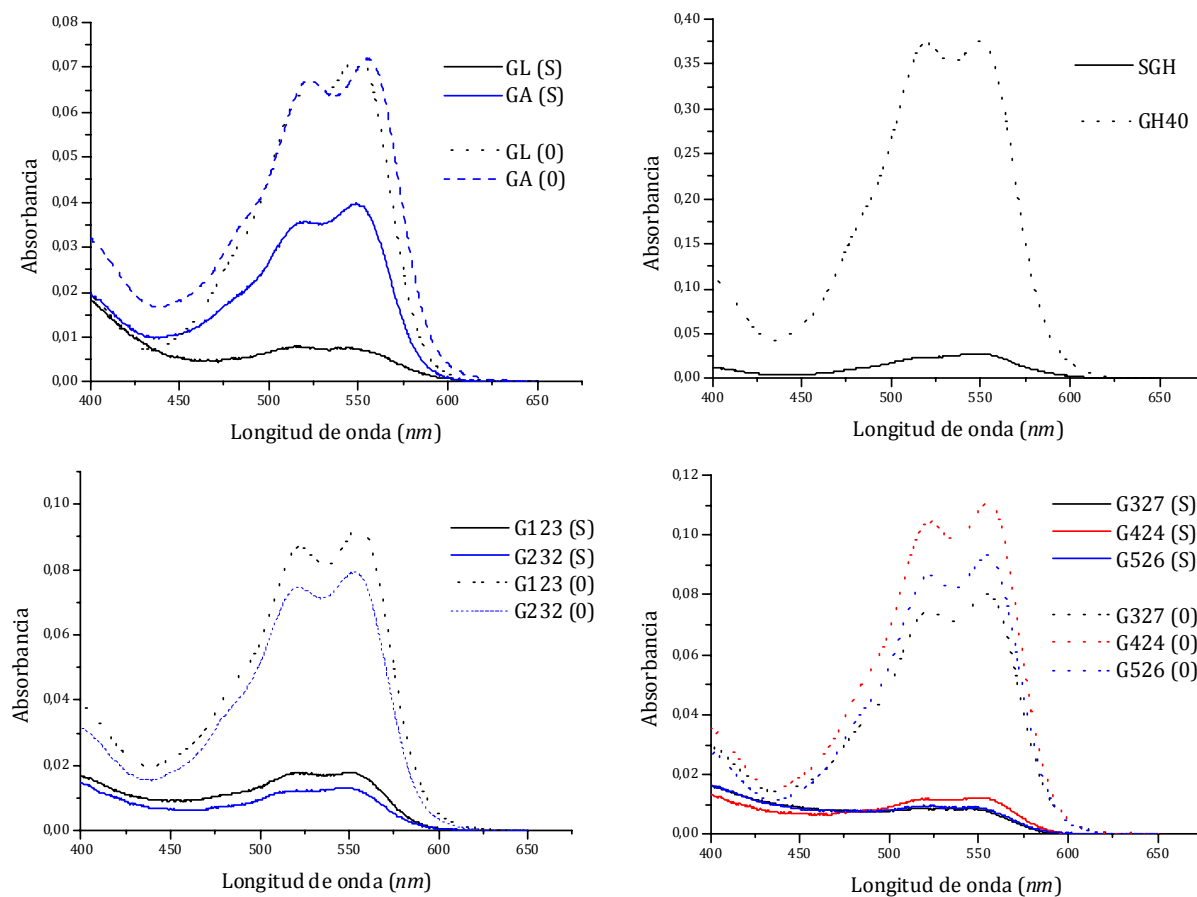


Figura 4.4.7. Comparativa de los espectros de absorción de las disoluciones: en las condiciones iniciales (0) y una vez alcanzado el equilibrio de hinchamiento (S).

Prácticamente en todos los casos la absorbancia disminuye drásticamente. A modo de ejemplo, la tabla 4.4.5 muestra la disminución porcentual de la absorbancia a la longitud de onda: $\lambda=550\text{nm}$ (cerca del pico más intenso de absorción).

Muestra	$A_{550\text{nm}}$ (S) (unid. absorbancia)	$A_{550\text{nm}}$ (0) (unid. absorbancia)	Disminución porcentual
G123	0,0179	0,0903	-80,19%
G232	0,0130	0,0787	-83,45%
G327	0,0082	0,0785	-89,55%
G424	0,0121	0,1080	-88,82%
G526	0,0091	0,0909	-90,01%
GL	0,0072	0,0726	-90,07%
GH	0,0275	0,3760	-92,68%
GA	0,0397	0,0700	-43,36%

Tabla 4.4.5. Disminución porcentual de la absorbancia de las disoluciones ($\lambda=550\text{nm}$).

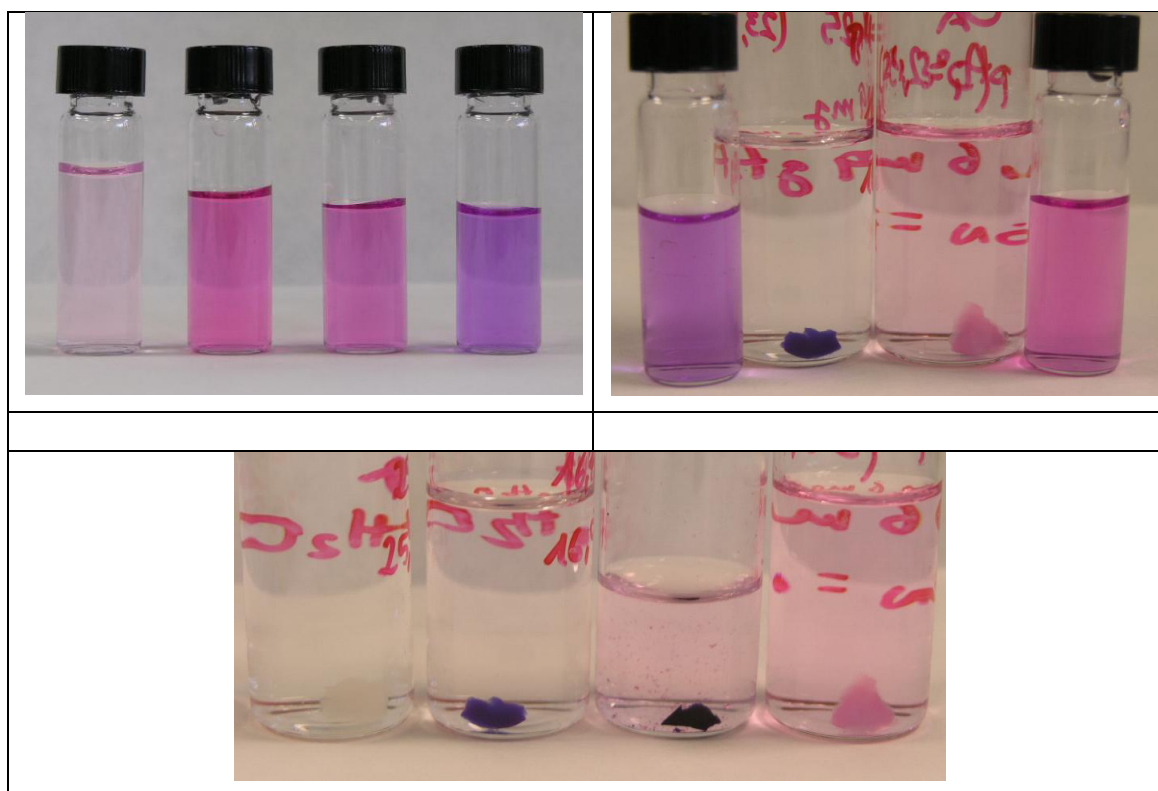


Figura 4.4.8. Cuatro muestras de la sonda C-SNARF-1: (a) $2\mu\text{M}$ -pH=7; (b) $14\mu\text{M}$ -pH=7; (c) $14\mu\text{M}$ -pH=9; (d) $14\mu\text{M}$ -pH=11. Junto a las muestras (b) y (d) se han colocado los geles GA y GL, respectivamente para comparar la coloración de los hidrogeles con el pH. Bajo estas líneas se muestran los geles GREF, GL, GH y GA (de izquierda a derecha).

*Si tu experimento necesita estadística,
deberías haber hecho uno mejor*

Ernest Rutherford

CAPÍTULO 5. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

A partir de las observaciones presentadas en el capítulo anterior, nos disponemos a analizar los resultados de cara a establecer un método que permita calcular el pH en el interior de hidrogeles y que tenga en cuenta todas las variables posibles. Resumimos, pues, las principales características encontradas para los elementos del fluorímetro, especialmente las fuentes de excitación y los parámetros que podemos controlar para la obtención de los decaimientos.

A pesar de la imposibilidad de utilizar la fluoresceína en el presente trabajo como sonda fluorescente para la medida del pH en el interior de un hidrogel, hemos dedicado un apartado a analizar las medidas realizadas en esta sonda, para así mostrar más claramente los pasos a seguir en la caracterización preliminar de una sonda sensible al pH, ya que se trata de una sonda ampliamente estudiada y su estudio puede ser extrapolado a otras sustancias menos conocidas.

Finalmente desarrollamos dos apartados destinados a analizar las propiedades del C-SNARF-1 como sonda sensible al pH, aplicadas a la búsqueda de un método fotofísico de medida del pH en el interior de un hidrogel de polielectrolito.

5.1. Características de funcionamiento del fluorímetro de resolución temporal

A partir de los datos de conteo promedio (*count rate*) medidos en las dos fuentes PLS (ver Tablas 4.1.4 y 4.1.5), hemos construido las gráficas en función de la intensidad porcentual que la fuente PDL 800-B entrega a la lámpara de diodo.

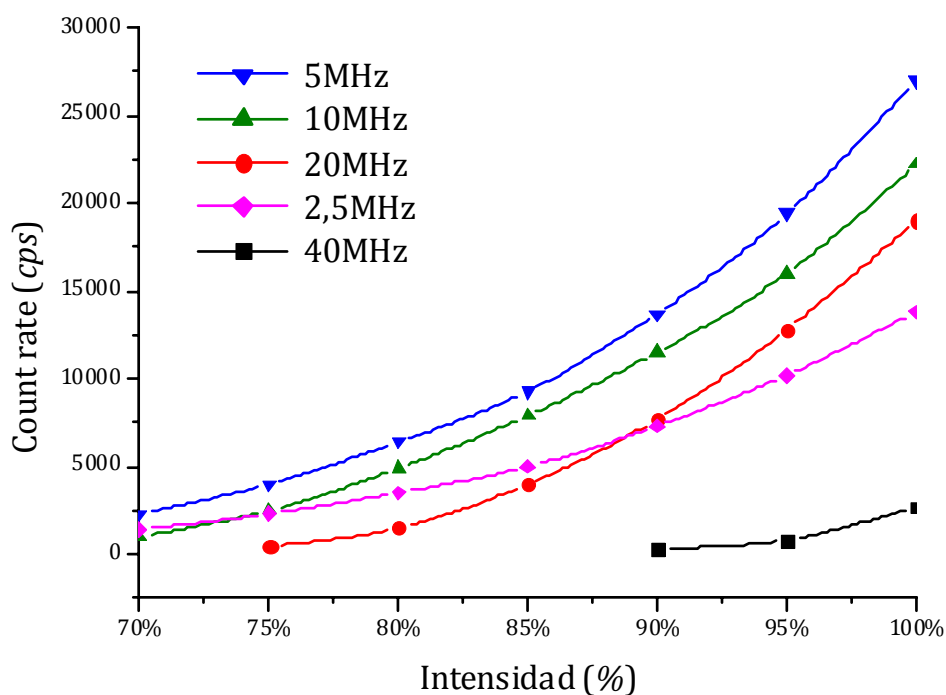


Figura 5.1.1. Conteo promedio de la fuente **PLS-8-2-372** (341nm), en función del porcentaje de intensidad total y de la frecuencia: (■) 40MHz; (●) 20MHz; (▲) 10MHz; (▼) 5MHz, (◆) 2,5MHz.

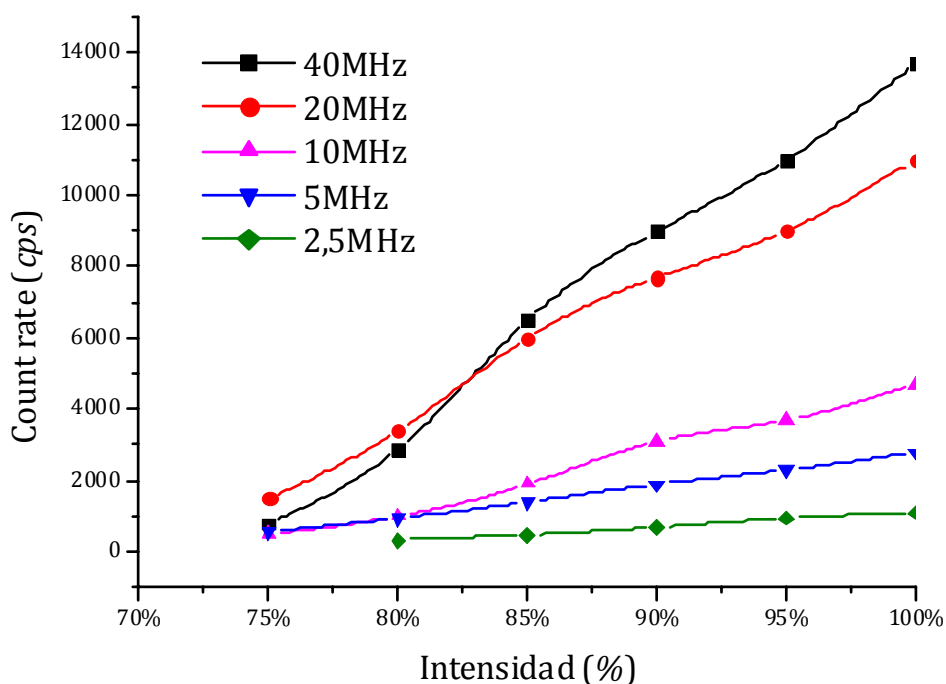


Figura 5.1.2. Conteo promedio de la fuente **PLS-8-2-218** (486nm), en función del porcentaje de intensidad total y de la frecuencia: (■) 40MHz; (●) 20MHz; (▲) 10MHz; (▼) 5MHz, (◆) 2,5MHz.

Para la fuente **PLS-8-2-372** la frecuencia que da más intensidad es la de 5MHz. Con el aumento de la frecuencia disminuye el *count rate* promedio en el detector. La intensidad a 2,5MHz resultó más baja que a otras frecuencias. El comportamiento de la fuente LED a 40MHz es excepcionalmente pobre, por lo que se desaconseja usar esta fuente a esta frecuencia. *Se recomienda utilizar la fuente entre 5MHz y 20MHz*, siempre con un conteo superior al 50% del máximo, lo que implica *seleccionar una intensidad igual o superior al 90% en el potenciómetro de intensidad* de la fuente PDL 800-B.

El comportamiento de la fuente **PLS-8-2-218** indica que el *count rate* promedio en el detector aumenta siempre cuando se aumenta la frecuencia de pulsación y se aumenta la intensidad porcentual de la potencia que la fuente PDL 800-B entrega a la lámpara. Sin embargo, resulta mucho más elevado el conteo *cuando la fuente se usa a 20MHz y 40MHz* (seleccionando un valor del potenciómetro de intensidad igual o superior al 85%).

Además, sobre esta fuente podemos añadir dos características más. En la figura 4.1.7 observábamos que, además de aumentar la intensidad luminosa, también aumenta hasta casi el doble el ancho espectral (Δ) de la lámpara cuando comparamos la excitación a 10MHz con la excitación a 20MHz. Por otra parte, el ancho de pulso cercano al nanosegundo, nos permite concluir que la fuente PLS-8-2-218 es *ideal para caracterizar sondas fluorescentes con un máximo de absorción cercano a 486nm y con tiempos de vida comprendidos entre 0,1ns y 10ns*.

Resumimos, finalmente los valores recomendados para el uso de las fuentes de excitación PLS. La tabla 5.1.1 se ha confeccionado con los resultados de los apartados 4.1.2, 4.1.3 y 4.14, así como con las conclusiones expuestas sobre estas líneas. Los valores comunes son parámetros que controla el software TimeHarp 200: la máxima resolución (**R**) que podemos seleccionar a una determinada frecuencia y la ventana de tiempos (Ω_{real}) en la que vamos a encontrar los canales del histograma de decaimiento, también en la ventana principal del software TimeHarp 200.

Los valores específicos para cada fuente PLS son el delay óptimo (δ_{opt}) que debemos seleccionar en el delay externo N107 (CAEN International) y el porcentaje de la intensidad que podemos seleccionar con el potenciómetro de intensidad de la fuente PDL 800-B.

Frecuencia	Valores comunes		PLS-8-2-372		PLS-8-2-218	
	R	Ω_{real}	δ_{0pt}	I _{Potenc}	δ_{0pt}	I _{Potenc}
40MHz	39ps	112ns – 137ns	21ns	N.O.	22ns	≥85%
20MHz	39ps	87ns – 137ns	20ns	≥90%	22ns	≥85%
10MHz	39ps	37ns – 137ns	17ns	≥90%	18ns	≥90%*
5MHz	78ps	97ns – 297ns	15ns	≥90%	10ns	N.O.
2,5MHz	156ps	215ns – 615ns	14ns	N.O.	6ns	N.O.

Tabla 5.1.1. Parámetros optimizados para el módulo PDL 800-B con las fuentes PLS-8-2-372 (341nm) y PLS-8-2-218 (486nm). (*) Valor recomendado.

5.2. Medidas de tiempo de vida de fluorescencia de sondas de referencia

Como indicamos anteriormente, una de las primeras ideas de este trabajo consistía en utilizar la fluoresceína como sonda sensible al pH en medidas de tiempos de vida de fluorescencia. Sin embargo, en la tabla 4.2.5 se puede ver claramente que todas las muestras preparadas tienen un único tiempos de vida ($\tau=4,03\pm0,02\text{ns}$), independiente del pH de la muestra. Esto se puede explicar utilizando el modelo de transferencia de carga en estado excitado del 2-naftol [57]. Lo que sucede es que la forma aniónica de la fluoresceína (predominante a partir de pH=5) tiene dos máximos de absorción en torno a 455nm y 475nm [56,60], pero se excita de manera poco eficiente a 486nm (máximo de intensidad de la fuente PLS). Por tanto, a cualquiera de los valores de pH considerados, la especie principalmente excitada es la forma totalmente deprotonada (dianión). Y si la fuente consigue excitar la especie aniónica, el pH favorece que ésta pase a la forma dianión en estado excitado, observándose un único tiempo de vida, el de la forma totalmente deprotonada de la fluoresceína.

Junto con estas medidas, habíamos utilizado la Rhodamina B como estándar de referencia para tiempos de vida. En la tabla 5.2.1 se muestra una comparativa entre los tiempos de vida calculados en este trabajo y algunos valores de referencia citados en la literatura, de donde podemos concluir que el montaje experimental de este fluorímetro tiene capacidad para determinar con gran precisión los tiempos de vida de fluorescencia de algunas sustancias como la fluoresceína o la Rhodamina B. Su extrapolación a otro tipo de compuestos debe verificarse, con las precauciones establecidas en el apartado anterior acerca de los límites de resolución (dentro del rango óptimo de uso del fluorímetro).

<i>Tiempo de vida de fluorescencia (ns)</i>		
Rhodamina B	Fluoresceína	Ref.
1,72±0,01	4,03±0,02	Medido
1,74±0,02	--	Ver 4.2.1
1,68	4,1±0,1	[7]

Tabla 5.2.1. Tabla comparativa entre los tiempos de vida de fluorescencia medidos en este trabajo y algunos valores de la literatura.

5.3. Determinación de la constante de disociación ácida de la sonda fluorescente

Con los resultados de la valoración espectrofotométrica de la fluoresceína podemos calcular los valores experimentales de las constantes de disociación ácida de la fluoresceína, tal como se indica en el apartado 3.2.4. El primer paso consiste en convertir los valores de absorbancia de la tabla 4.2.4 en términos del coeficiente de extinción molar, dividiendo las medidas por el valor de la concentración ($4,57\mu\text{M}$). Estos cálculos figuran en la tabla 5.3.1.

pH	<i>Coeficiente de extinción molar ($M^{-1}\text{cm}^{-1}$)</i>		
	$\epsilon(437\text{nm})$	$\epsilon(464\text{nm})$	$\epsilon(491\text{nm})$
1,06	47563	7625	2438
1,27	46814	8237	3181
1,44	45543	8562	3643
1,58	43848	8867	4092
1,76	41123	8849	4164
1,86	39696	8905	4399
2,00	37229	9032	4956
2,18	33769	9179	5439
2,29	31627	9167	5500
2,46	28348	9178	5925
2,60	26003	9371	6208
2,74	24089	9565	6613
3,22	19998	10713	7618
4,14	19985	18430	12566
5,85	22318	32277	33237
6,92	15399	32964	67252
8,70	12907	33655	82267
10,29	13096	33953	83185
10,87	14336	35044	84302

Tabla 5.3.1. Coeficiente de extinción molar de la fluoresceína ($4,57\mu\text{M}$) a diferentes longitudes de onda, en función del pH

Después hay que seleccionar un rango de valores (sombreados en la tabla) para cada longitud de onda a los que aplicar la ecuación [3.11] (variante de la ecuación de Henderson-Hasselbach) del apartado 3.2.4. Con la curva a 437nm podemos calcular el pK_a de la transición **catión** \rightleftharpoons **neutro**. Con la curva a 464nm podemos hacer lo propio para la transición **neutro** \rightleftharpoons **anión** y finalmente, con la curva a 491nm podemos determinar la transición **anión** \rightleftharpoons **dianión**. Las tablas 5.3.2 y 5.3.3 muestran los cálculos efectuados, indicando los valores límite de referencia para la forma protonada (a) y la forma deprotonada (b) en cada caso.

pH	$\log_{10} \left(\frac{\varepsilon - \varepsilon_a}{\varepsilon_b - \varepsilon} \right)$		
	437nm	464nm	491nm
1,86	-0,3751	--	--
2,00	-0,2040	--	--
2,18	0,0143	--	--
2,29	0,1487	--	--
2,46	0,3719	--	--
2,60	0,5640	--	--
2,74	0,7669	--	--
3,22	--	-1,4947	--
4,14	--	-0,2377	-2,1014
5,85	--	1,4890	-0,3784
6,92	--	--	0,5184
8,70	--	--	--
<hr/>			
ε_a (M ⁻¹ cm ⁻¹)	48000	10000	12000
ε_b (M ⁻¹ cm ⁻¹)	20000	33000	84000

Tabla 5.3.2. Cálculo a partir de la ecuación de Henderson-Hasselbach para determinar la constante de disociación ácida de una muestra de fluoresceína (4,57μM)

Para determinar el valor de la constante de disociación ácida, Lindqvist supone que en el punto de pK_a el coeficiente de extinción molar es el promedio entre la forma protonada y la forma deprotonada, de forma que el término logarítmico se anula. Por tanto, gráficamente consiste en encontrar el punto donde la recta de regresión lineal cruza el eje de abscisas ($pK_a = -n/m$).

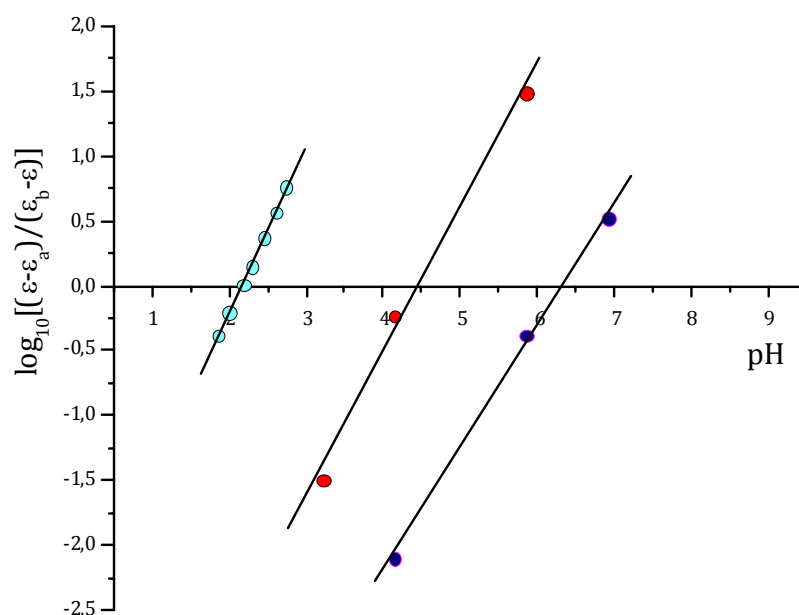


Figura 5.3.1. Representación gráfica para determinar los puntos correspondientes a las constantes de disociación ácida de la fluoresceína.

<i>Ajuste por mínimos cuadrados ($y=mx+n$)</i>					
	<i>m</i>	<i>n</i>	<i>R</i> ²	p <i>K</i> _a	p <i>K</i> _a (Ref.)
437nm	1,2907	-2,7902	0,9988	2,16	2,2
464nm	1,1187	-5,0072	0,9934	4,48	4,4
491nm	0,9484	-5,9997	0,9977	6,33	6,7

Tabla 5.3.3. Cálculo de la constante de disociación ácida de la fluoresceína a partir de los ajustes por mínimos cuadrados de los datos calculados en la tabla 5.3.2

La coincidencia entre los valores calculados y la referencia de Lindqvist ^[56] muestra un gran acuerdo, a pesar de los pocos puntos tomados para algunos cálculos, debido a que cerca del punto de equivalencia ácido-base hay menos datos de pH disponibles. De forma que podemos concluir que *el método, propuesto para calcular la constante de disociación ácida a través de la valoración espectrofotométrica de la sonda fluorescente, resulta ampliamente satisfactorio.*

5.4. Caracterización del C-SNARF-1 como sonda fluorescente sensible al pH

5.4.1. Parámetros fotofísicos de la sonda C-SNARF-1

En primer lugar, determinamos el coeficiente de extinción molar para las cuatro muestras de calibrado, preparadas a distintas concentraciones y con un pH cercano a 7 ($6,90 \pm 0,07$). Para ello tomamos los valores de absorbancia de los máximos a 521nm y 550nm, con los que construir las rectas de ajuste de la tabla 5.4.1.

	<i>m</i>	Δm	<i>n</i>	Δn	<i>R</i> ²	<i>t_M</i>	<i>t_N</i>
521nm	29600	917	$9,90 \cdot 10^{-3}$	$3,55 \cdot 10^{-3}$	0,9990	32,277	2,786
550nm	27940	367	$-1,66 \cdot 10^{-5}$	$1,42 \cdot 10^{-3}$	0,9998	76,170	0,012

Tabla 5.4.1. Parámetros de ajuste de regresión lineal para determinar el coeficiente de extinción molar de la sonda C-SNARF-1.

En el ajuste de mínimos cuadrados se han calculado los parámetros tal como se indica en el apéndice A.5. Para una muestra de cuatro elementos, el valor del estadístico t-Student para una predicción con dos colas al 95% de fiabilidad es $t(2; 0,975)=4,303$. Por tanto, aceptamos la hipótesis nula ($n=0$) para las ordenadas en el origen y podemos dar un valor para el coeficiente de extinción molar:

	$\epsilon (M^{-1}cm^{-1})$	$\log_{10} \epsilon$
521nm	29600 ± 900	$4,47 \pm 0,07$
550nm	27900 ± 400	$4,45 \pm 0,03$

Tabla 5.4.2. Coeficiente de extinción molar del C-SNARF-1 ($pH=6,90 \pm 0,07$) a dos longitudes de onda; expresado su valor natural y en forma logarítmica.

Utilizando estos valores para recalcular los espectros de absorción en términos del coeficiente de extinción molar, el promedio de los cuatro espectros de absorción se muestra en la figura 5.4.1.

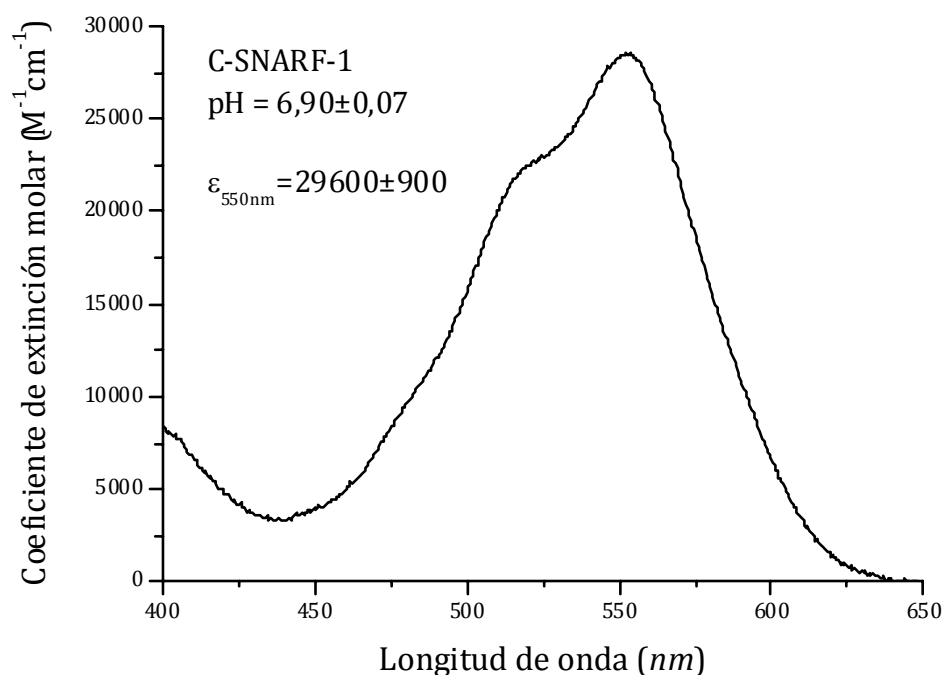


Figura 5.4.1. Absorción del C-SNARF-1 en términos del coeficiente de extinción molar

A partir de este espectro podemos extrapolar el resultado para otros valores de pH, teniendo en cuenta las diferentes concentraciones, pudiendo establecer de forma aproximada los espectros de absorción de la sonda a diferentes valores de pH, tal como se muestra en la figura 5.4.2.

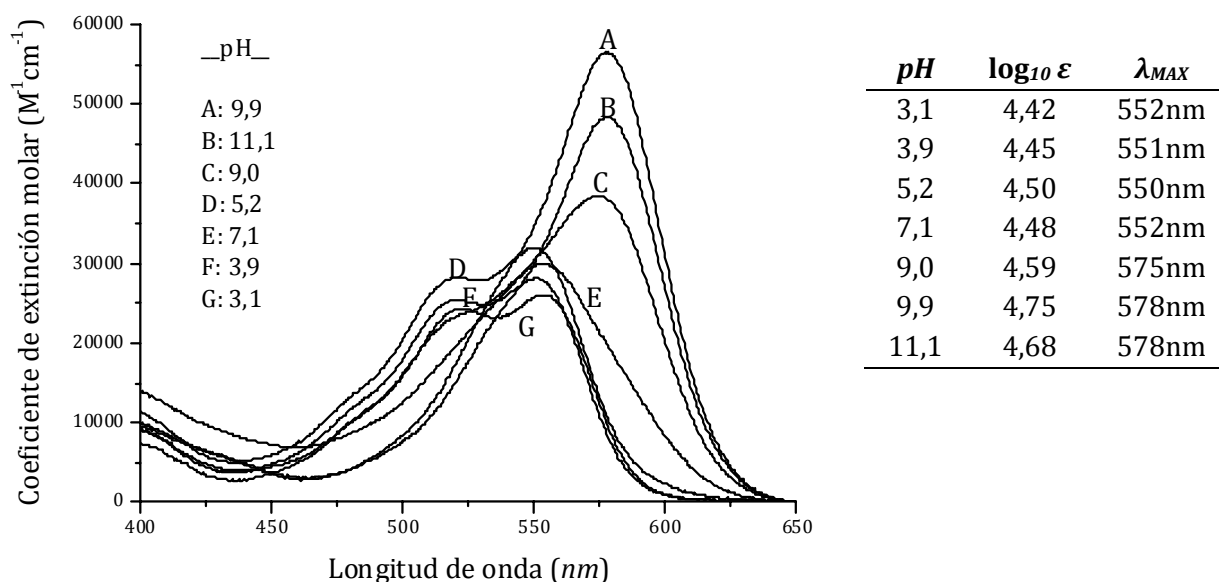


Figura 5.4.2. Cálculo aproximado de la absorbancia de la sonda C-SNARF-1 en términos del coeficiente de extinción molar

Los espectros de absorción muestran una clara diferencia entre una forma protonada a pH ácido (con un máximo de absorción en torno a 550nm) y una forma deprotonada a pH alcalino con un máximo en torno a 575nm. Sin embargo, el comportamiento en la zona intermedia de pH es realmente complejo. A medida que aumenta el pH aumenta la absorción pero cerca del pH neutro sufre de nuevo una disminución, para finalmente aumentar hasta casi el doble, cuando la forma predominante es la especie deprotonada. Este comportamiento “oscilante” dificulta poder recurrir a la sonda C-SNARF-1, ya que su pKa de referencia es 7,5 y el pKa del imidazol es cercano a 7. *Si en un entorno del pH neutro aparecen variaciones no lineales en el pH, la interpolación de nuevos valores experimentales puede resultar equívoca.* Análogamente, observando los espectros de emisión de la sonda, observamos el mismo tipo de comportamiento que hemos descrito al analizar sus espectros de absorción: la sonda tiene una variación no lineal de su emisión en función del pH cuando el pH es demasiado bajo o demasiado alto.

Seguidamente se muestran los cálculos del rendimiento cuántico del C-SNARF-1 a partir de las medidas comparadas con una referencia de Rhodamina 6G, tal como se indicó anteriormente en el apartado 4.2.3. Para los cálculos se usaron las expresiones indicadas en el apartado 3.2.2.3. Recordamos que la concentración de las tres muestras era la misma (4μM) y que los espectros de emisión se obtuvieron excitando las tres muestras a 486nm. El intervalo de integración de la absorbancia está comprendido entre 550nm y 700nm (ver figura 4.2.7).

	$A_{INT} (M^{-1})$	$\epsilon_{486} (M^{-1}cm^{-1})$	Φ
<i>Rhodamina 6G</i>	0,40811	24500	0,94
<i>C-SNARF-1 (pH=6)</i>	0,14619	13160	0,63
<i>C-SNARF-1 (pH=10)</i>	0,08238	5900	0,79

Tabla 5.4.3. Rendimiento cuántico de la sonda C-SNARF-1 a distintos valores de pH

5.4.2. Uso del C-SNARF-1 como sensor de pH por métodos ratiométricos

A partir de los espectros de absorción presentados en el apartado 4.2.3 hemos seleccionado tres longitudes de onda para calcular el cociente de absorbancias y emplear estos valores para construir una curva ratiométrica de calibrado para el pH, tal como se había explicado en el apartado 3.2.3.1. Los puntos experimentales (ver tabla 5.4.3) se han ajustado a una función sigmoideal, también llamada logística generalizada o curva de Richards [98-99], cuya fórmula general es:

$$A(pH) = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + 10^{k(pH_k - pH)}} \quad [5.1]$$

Donde A_1 y A_2 son los límites inferior y superior, respectivamente; k es la tasa de crecimiento y pH_k es el valor de pH donde ocurre un mayor crecimiento. Las figuras 5.4.3 y 5.4.4 muestran los puntos experimentales y las curvas de ajuste sigmoidal.

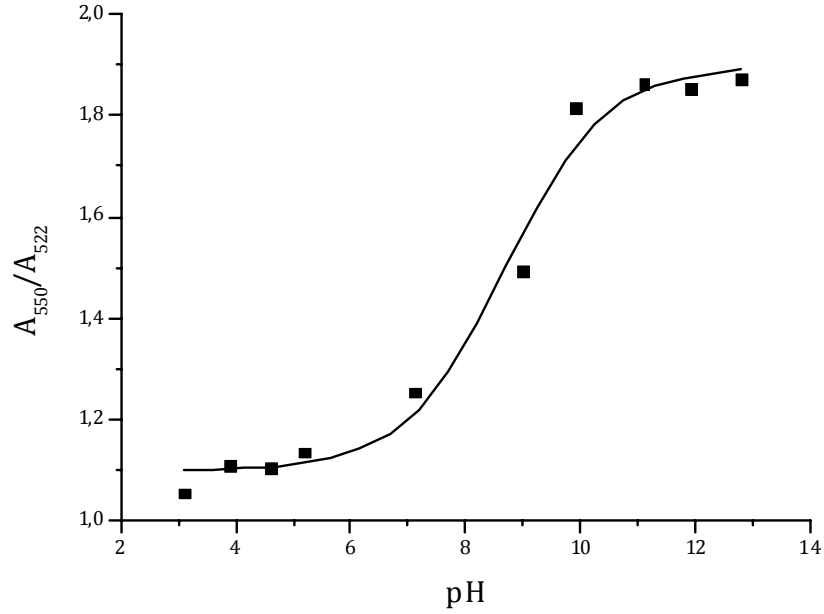


Figura 5.4.3. Ajuste sigmoidal para el cociente de absorbancias a 550nm y 522nm.

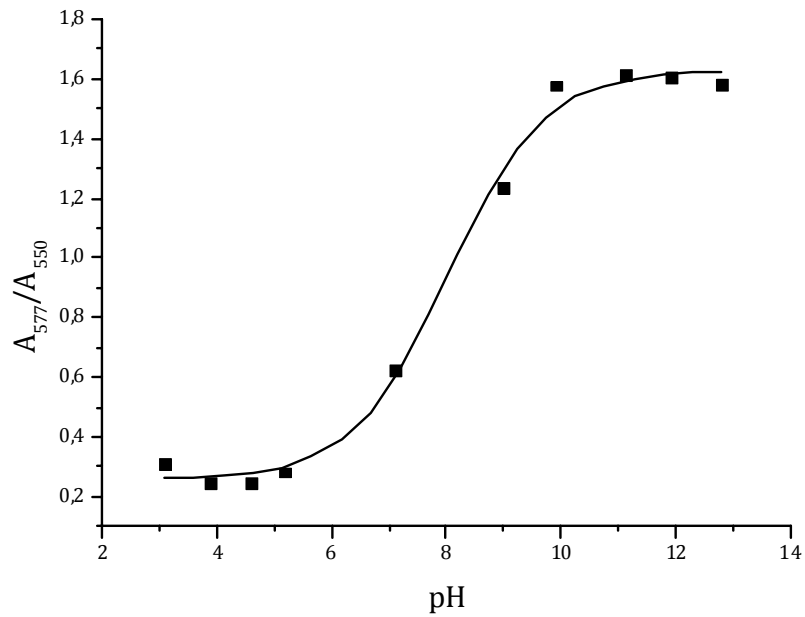


Figura 5.4.4. Ajuste sigmoidal para el cociente de absorbancias a 577nm y 550nm.

	A_1	A_2	k	pH_k
A_{550}/A_{522}	$1,10 \pm 0,03$	$1,90 \pm 0,04$	$0,5 \pm 0,1$	$8,7 \pm 0,2$
A_{577}/A_{550}	$0,26 \pm 0,03$	$1,63 \pm 0,04$	$0,52 \pm 0,07$	$8,0 \pm 0,2$

Tabla 5.4.3. Parámetros de ajuste sigmoidal del método de calibración ratiométrica para la determinación del pH de la sonda C-SNARF-1

Para poder utilizar con más fiabilidad este método ratiométrico se precisaría obtener la absorbancia de la sonda en más puntos comprendidos entre pH=6 y pH=10. Por debajo del límite inferior aparece también la dificultada apuntada anteriormente: *la absorción del C-SNARF-1 no sigue una variación lineal, lo que reduce la precisión de este método ratiométrico*. Como además, no se midió la absorbancia de los geles, no se utilizará este método para el cálculo del pH en el interior de los hidrogel.

5.4.3. Uso del C-SNARF-1 como sensor de pH por medidas de resolución temporal

Aunque observando los tiempos de vida promedio para la sonda (ver figura 4.3.2) se comprueba que existe una clara disminución, los tiempos de vida y los factores preexponenciales para cada uno de los decaimientos muestran un comportamiento complejo que no se asemeja al modelo de dos estados del 2-naftol ^[57] y por tanto *no podemos definir una curva de calibrado simple que defina unívocamente el estado excitado de la sonda con el pH de su entorno*.

5.5. Determinación fotofísica del pH en el interior de un hidrogel

5.5.1. Grado de hinchamiento de hidrogel

Cuando en el capítulo 4 determinábamos el pH de la disolución sobrenadante, una vez alcanzado el equilibrio de hinchamiento, mostramos dos formas de cálculo de dicho valor: a través del promedio a partir de la segunda semana o mediante un ajuste exponencial. En la tabla 4.4.2 aparecen los valores calculados por ambos métodos. Sin embargo, la ventaja de utilizar el ajuste exponencial (ecuación [3.22] en el apartado 3.2.6.2) es que podemos utilizar la constante de tiempos del modelo exponencial para calcular el tiempo que tarda cada hidrogel en alcanzar el equilibrio. Este dato resulta práctico si se desea optimizar el tiempo a la hora de planificar un experimento. Se indica

en la tabla 5.5.1 los parámetros de ajuste que se corresponden al modelo del apartado 3.2.6.2, cuya fórmula era:

$$pH(t) = pH_i + \Delta_{pH}(1 - e^{-k_{pH}t}) \quad [3.22]$$

	pH_i	$T_i (^{\circ}C)$	pH_s	Δ_{pH}	$k_{pH}(días^{-1})$	$t_s(días)$
G1-23	2,27	23,4	3,47	1,20	0,49	6,1
G4-24	2,40	23,8	3,68	1,28	0,69	4,3
GA	2,51	24,3	5,61	3,10	0,46	6,6
G5-26	2,61	23,5	4,08	1,47	1,33	2,3
G3-27	2,73	23,7	4,65	1,92	1,19	2,5
G2-32	3,19	23,7	6,00	2,81	0,57	5,2
GRAF	3,78	25,0	5,98	2,20	0,28	10,8
GH	3,90	24,7	6,31	2,41	0,90	3,3
GL	4,25	23,7	6,82	2,57	0,76	3,9

Tabla 5.5.1. Parámetros de ajuste exponencial para el equilibrio de hinchamiento

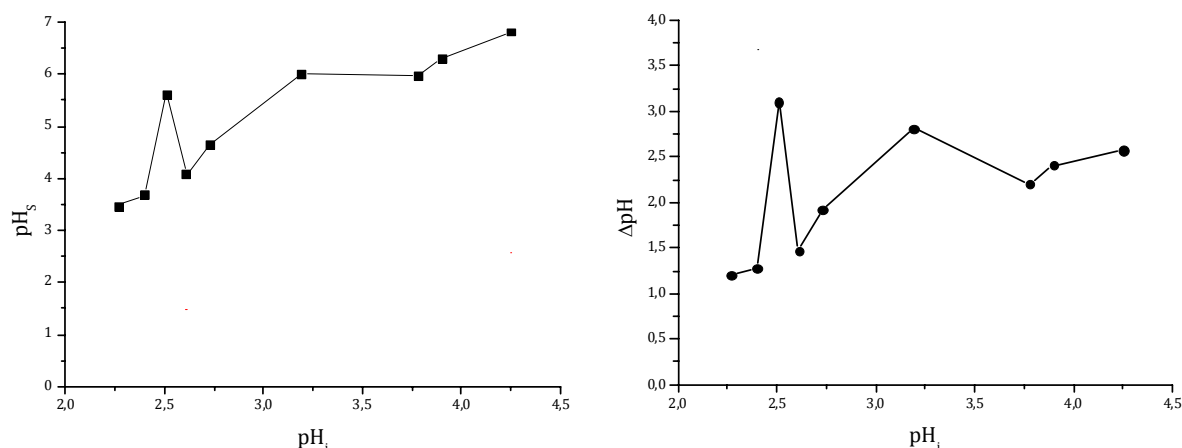


Figura 5.5.1. Variación del pH de equilibrio (pH_s) y del aumento de pH (Δ_{pH}) en función de las condiciones iniciales (pH_i)

A partir de la gráfica podemos ver que la muestra GA presenta un comportamiento anómalo respecto del resto, ya que su aumento de pH supera al que cabría esperar para esas condiciones. En general, la tendencia que se observa es que a mayor pH inicial, mayor es la variación total de pH que cabe esperar.

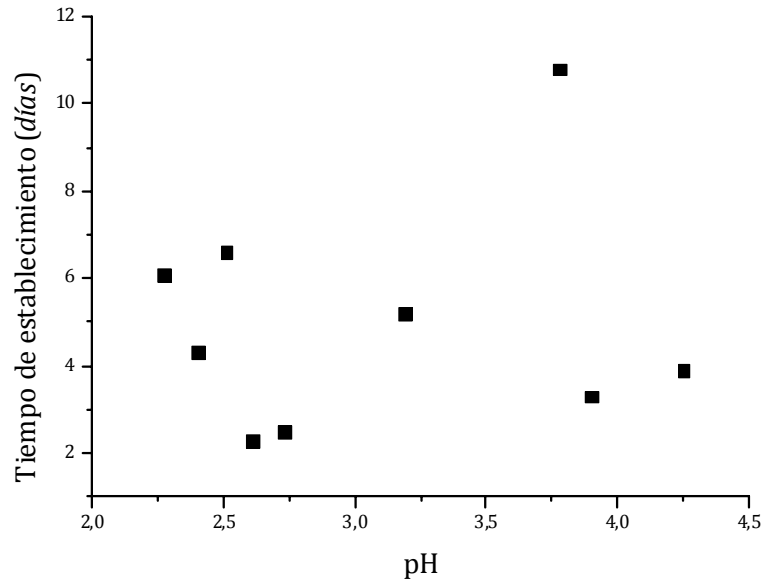


Figura 5.5.2. Tiempo de establecimiento del equilibrio en función del pH inicial

Respecto al tiempo de establecimiento calculado no se encuentra ninguna correlación con las condiciones iniciales: ni con el pH inicial, ni con el peso del gel seco. El promedio del tiempo de establecimiento para los hidrogeles PVI40(2) es de aproximadamente 5 días, lo que significa que *transcurrida una semana se habrá alcanzado prácticamente el equilibrio*. Se recomienda, no obstante, prolongar un poco este tiempo, ya que la temperatura ambiente puede variar. A modo de ejemplo, presentamos en la figura 5.5.3 la evolución temporal de la temperatura del laboratorio durante todos los días en que se estuvo midiendo el pH de la disolución sobrenadante.

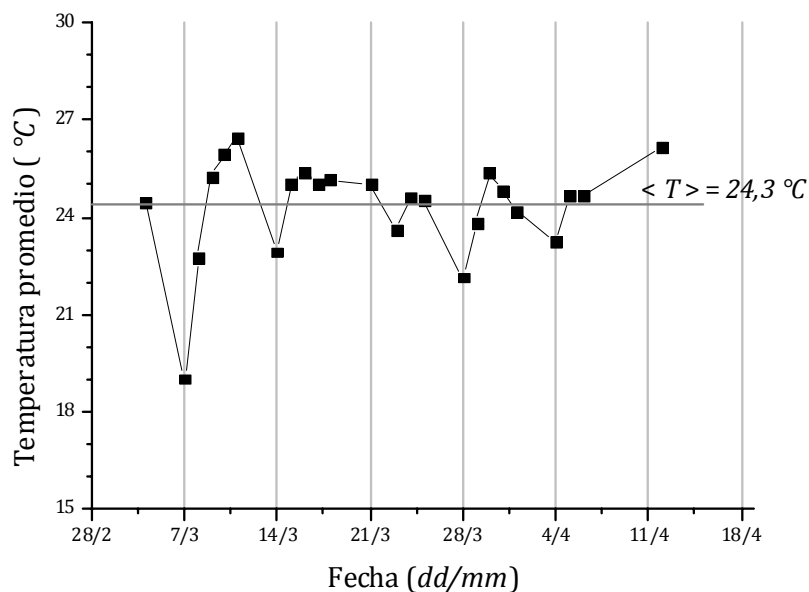


Figura 5.5.3. Evolución temporal de la temperatura del laboratorio durante las medidas de pH en el tiempo de establecimiento del equilibrio de hinchamiento

Por otro lado, acerca del grado de hinchamiento de los geles podemos decir que los valores medidos en el presente trabajo guardan una buena relación con los valores determinados previamente por Molina, Gómez-Antón y Piérola [29-30].

	pH_i	$S (g_{hinc}/g_{seco})$	$S (Ref.)$
REF	3,78	$9,40 \pm 0,04$	7
GL	4,25	$6,25 \pm 0,04$	5
GH	3,90	$7,10 \pm 0,07$	7
GA	2,51	$14,12 \pm 0,08$	17,5
G1-23	2,27	$16,97 \pm 0,04$	18,5
G2-32	3,19	$10,03 \pm 0,03$	12,5
G3-27	2,73	$13,66 \pm 0,03$	16
G4-24	2,40	$16,56 \pm 0,02$	18
G5-26	2,61	$15,35 \pm 0,03$	17

Tabla 5.5.2. Comparativa del grado de hinchamiento entre los valores medidos en el presente trabajo y la referencia citada

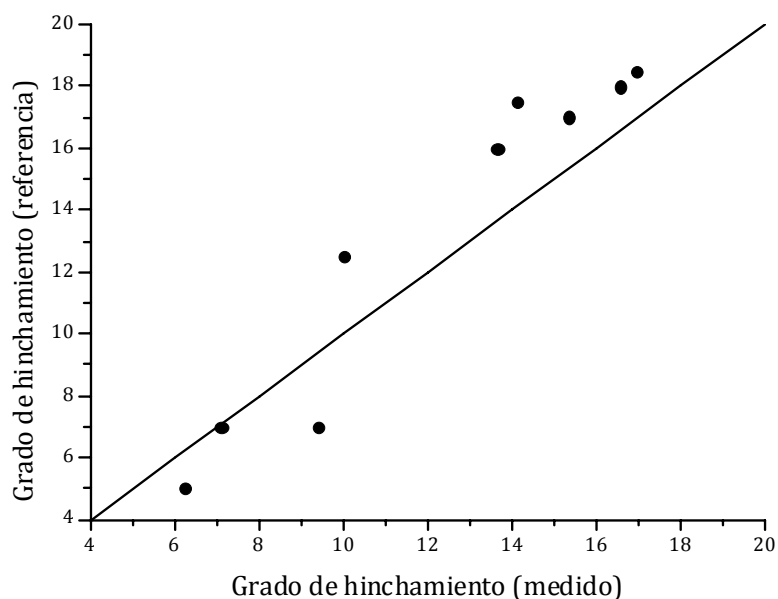


Figura 5.5.4. Comparativa entre valores medidos y de referencia para el grado de hinchamiento de los hidrogeles PVI40(2). La línea recta representa el caso ideal: $S_{med}=S_{ref}$.

5.5.2. Valores calculados de pH en el interior de los hidrogeles

A partir de las medidas de hinchamiento y de las fórmulas [3.25-3.29] del apartado 3.2.6.3, vamos a calcular el valor de las magnitudes que nos permitirán calcular el pH en el interior del gel a través de las medidas de pH inicial y de equilibrio.

Determinamos en primer lugar el valor de la fracción en volumen de hidrogel (v_2), la relación C_G/C de concentraciones y la fracción de disolución que permanece en el sobrenadante (σ). Recordemos que los valores de densidad para el agua y para el hidrogel son de 1g/cm^3 y $1,25\text{g/cm}^3$, respectivamente.

	m_o (mg)	V_T (ml)	S (g/g)	v_2	C_G/C	σ
REF	25,5	25,6	$9,40\pm0,04$	$0,093\pm0,011$	110 ± 13	$0,992\pm0,012$
GL	19,6	19,6	$6,25\pm0,04$	$0,15\pm0,03$	160 ± 30	$1,00\pm0,02$
GH	11,2	11,2	$7,10\pm0,07$	$0,13\pm0,02$	140 ± 30	$1,00\pm0,03$
GA	19,6	19,6	$14,12\pm0,08$	$0,060\pm0,005$	72 ± 6	$1,00\pm0,02$
G1-23	44,6	44,8	$16,97\pm0,04$	$0,049\pm0,003$	60 ± 4	$0,984\pm0,007$
G2-32	44,0	44,1	$10,03\pm0,03$	$0,087\pm0,009$	101 ± 11	$0,991\pm0,007$
G3-27	50,6	50,6	$13,66\pm0,03$	$0,062\pm0,005$	70 ± 6	$0,987\pm0,006$
G4-24	78,0	78,0	$16,56\pm0,02$	$0,051\pm0,003$	60 ± 4	$0,984\pm0,004$
G5-26	55,0	55,5	$15,35\pm0,03$	$0,055\pm0,004$	70 ± 5	$0,986\pm0,006$

Tabla 5.5.3. Valor de algunas magnitudes características del hinchamiento de los geles

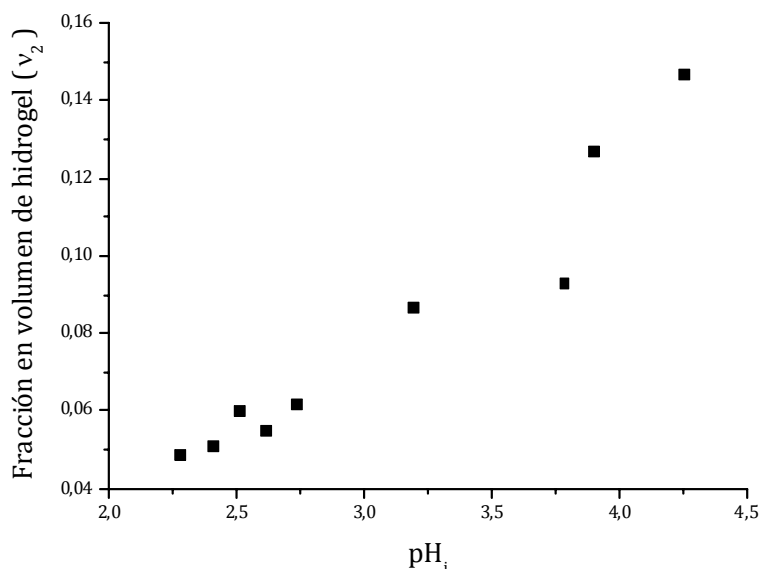


Figura 5.5.5. Relación entre la fracción en volumen de hidrogel en el estado hinchado en función del pH inicial

En los tres parámetros aparece una clara dependencia con el pH inicial que podemos explicar. En primer lugar, la fracción en volumen de hidrogel (ver figura 5.5.5) tiene que aumentar con el pH, ya que su inversa sigue una relación lineal con el grado de hinchamiento. Por tanto, en esta región entre el hinchamiento máximo y mínimo del hidrogel, se espera que la fracción en volumen de hidrogel aumente con el pH de estas

disoluciones. Si se prepararan muestras a pH mayores, debería observarse un valor límite para la fracción en volumen cercano a $v_{2,lim} \sim 0,14$ (de acuerdo con Molina, Gómez-Antón y Piérola [29]). Del mismo modo, el cociente (C_G/C) es proporcional a la fracción en volumen, por lo que su aumento debe ir en consonancia con los cambios en v_2 . Finalmente, lo mismo se puede decir de la fracción de disolución que permanece como sobrenadante.

A continuación presentamos los cálculos del pH en el interior del gel. En el segundo capítulo hemos expuesto con detalle el modelo de hinchamientos, que en ausencia de sales que contribuyan con iones adicionales, permite calcular el pH en el interior de un gel a través de la ecuación [2.34] del apartado 2.2.3. En la tabla 5.5.4 comparamos nuestros cálculos con los valores interpolados gráficamente, tomados de la referencia anterior [29].

	Valores experimentales			Referencia		Desviaciones	
	pH_i	pH_s	pH_G	pH_s	pH_G	ΔpH_s	ΔpH_G
G1-23	2,27	3,47	6,4	3,00	5,7	0,47	0,7
G4-24	2,40	3,68	6,7	3,40	6,5	0,28	0,2
GA	2,51	5,61	10,6	3,75	7,0	1,86	3,6
G5-26	2,61	4,08	7,4	4,00	7,3	0,08	0,1
G3-27	2,73	4,65	8,4	4,25	7,8	0,40	0,6
G2-32	3,19	6,00	10,8	5,00	9,0	1,00	1,8
GREF	3,78	5,98	10,2	6,20	10,8	0,22	0,6
GH	3,90	6,31	10,9	6,35	11,0	0,04	0,1
GL	4,25	6,82	11,8	6,60	11,5	0,22	0,3

Tabla 5.5.4. Valores calculados del pH en el interior de los hidrogeles, comparados con los valores de referencia

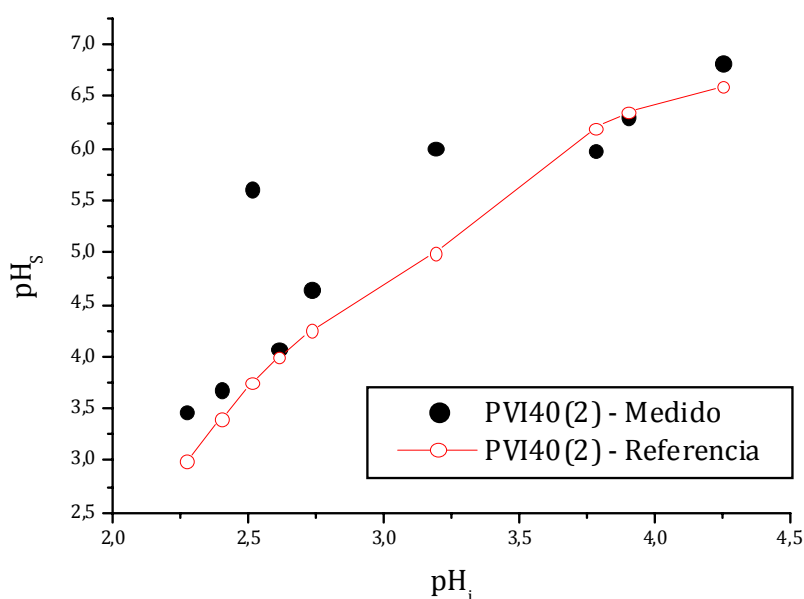


Figura 5.5.6. Comparativa entre las medidas de este trabajo y los valores de referencia para el pH de la disolución sobrenadante

Salvo las muestras GA y G2-32, existe un gran acuerdo entre nuestras medidas experimentales y los valores de la literatura, lo que nos permite afirmar que nuestros cálculos y medidas en los geles de polivinilimidazol son perfectamente comparables.

5.5.3. Características de los hidrogeles obtenidas por espectroscopía de fluorescencia

Aunque el comportamiento de la sonda C-SNARF-1 es complejo, podemos intentar determinar el pH interno en el gel a partir de las medidas de tiempos de vida. En tal caso, observamos al comparar los tiempos de vida de la sonda en disolución y en el interior del gel una reducción considerable de uno de los tiempos de vida. Mientras que el mayor de los tiempos de vida de la sonda en disolución es $4,0 \pm 0,1$ ns, el mayor de los tiempos de vida de la sonda en el gel es $2,4 \pm 0,3$ ns. Esta reducción no puede explicarse por la rigidez de la matriz de hidrogel, cuyo efecto sería más bien el contrario. Entre las posibles causas está la interacción de la sonda con el grupo imidazol en el estado excitado o los efectos de homotransferencia de energía de la sonda, debido a su concentración.

A través de los factores preexponenciales podemos encontrar una relación, si bien no encontramos una identidad directa, debido a que hay varios valores de pH para un mismo par de factores preexponenciales. El problema consiste en asignar un pH a partir de los valores α_1 y α_2 calculados por eje ajuste exponencial. Por interpolación de los valores medidos en los geles (ver tabla 4.4.4) con los medidos en la sonda (ver tabla 4.4.1), podemos estimar el pH interno del gel. Dado que los factores preexponenciales son variables dependientes ($\alpha_1 + \alpha_2 = 1$), basta analizar uno de ellos. Teniendo en cuenta el comportamiento decreciente-creciente de α_1 en la sonda, podemos encontrar una estimación por debajo de pH=7 y otra por encima de pH=7.

	pH _i	α_1 (gel)	pH _G (pH<7)	pH _G (pH>7)	pH _G (calc)	pH _G (exp)	Δ pH _G
G1-23	2,27	0,2659	6,2	9,2	6,4	6,2	0,2
G4-24	2,40	0,2132	6,5	9,1	6,7	6,5	0,2
GA	2,51	0,1576	6,8	9,0	10,6	9,0	1,6
G5-26	2,61	0,2004	6,6	9,1	7,4	6,6	0,8
G3-27	2,73	0,3825	5,5	9,3	8,4	9,3	0,9
G2-32	3,19	0,7423	--	9,8	10,8	9,8	1,0
GH	3,90	1	--	$\geq 10,25$	10,9	$\geq 10,25$	--
GL	4,25	1	--	$\geq 10,25$	11,8	$\geq 10,25$	--

Tabla 5.5.5. Valores de pH interno (pH_G) interpolados a partir de los factores preexponenciales de la sonda C-SNARF-1

Al comparar los valores calculados de pH interno según la fórmula [3.24] con las alternativas interpoladas, descubrimos algunas discrepancias relativamente aceptables, si bien comprobamos que no podemos determinar unívocamente el valor de pH; no debido a la imprecisión de las medidas, sino a la compleja variación del estado excitado de la sonda C-SNARF-1 con el pH. Prácticamente en todos los casos se observa que la medida de pH obtenida por tiempos de vida de fluorescencia subestima el pH en el interior del hidrogel con respecto a los valores teóricos.

No conocemos el pH en el interior del hidrogel pero sí podemos buscar el mejor ajuste posible entre los decaimientos de la sonda en disolución y las medidas en los hidrogeles. Por una simple transformación lineal ($pH = pH_i \cdot a + b$), podemos asignar los valores de a y b , tales que ajusten lo mejor posible los factores preexponenciales en el hidrogel a los de la sonda, tal como se muestra en la figura 5.5.7. Si ahora comparamos al relación entre el pH inicial y el pH calculado con la recta de regresión dada por los parámetros a y b , comprobamos (ver figura 5.5.8) que para $pH < 10$, el pH medido por tiempos de vida de fluorescencia siempre es una subestimación de los valores calculados con el modelo de hinchamiento propuesto.

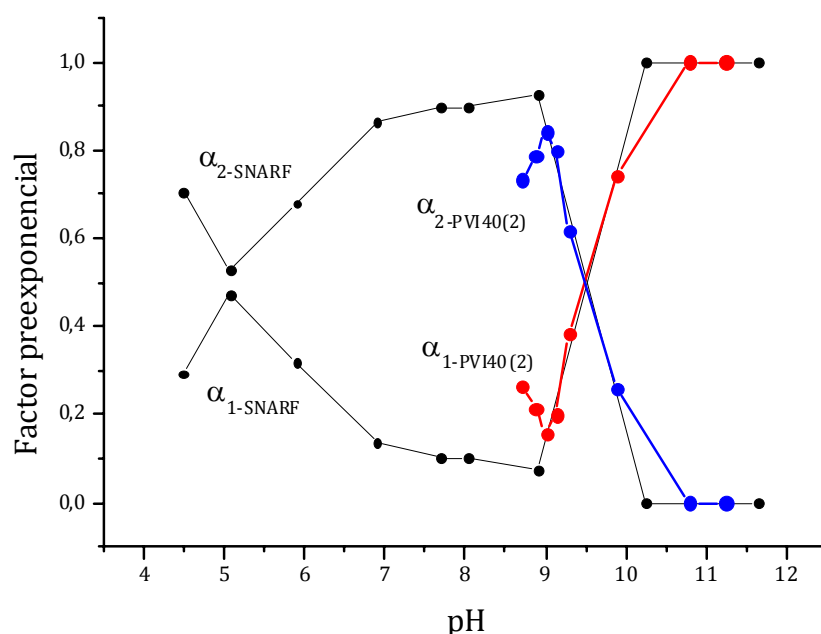


Figura 5.5.7. Comparativa entre los factores preexponenciales de la sonda en disolución (en negro) y de la sonda en el interior de los hidrogeles (en rojo y azul)

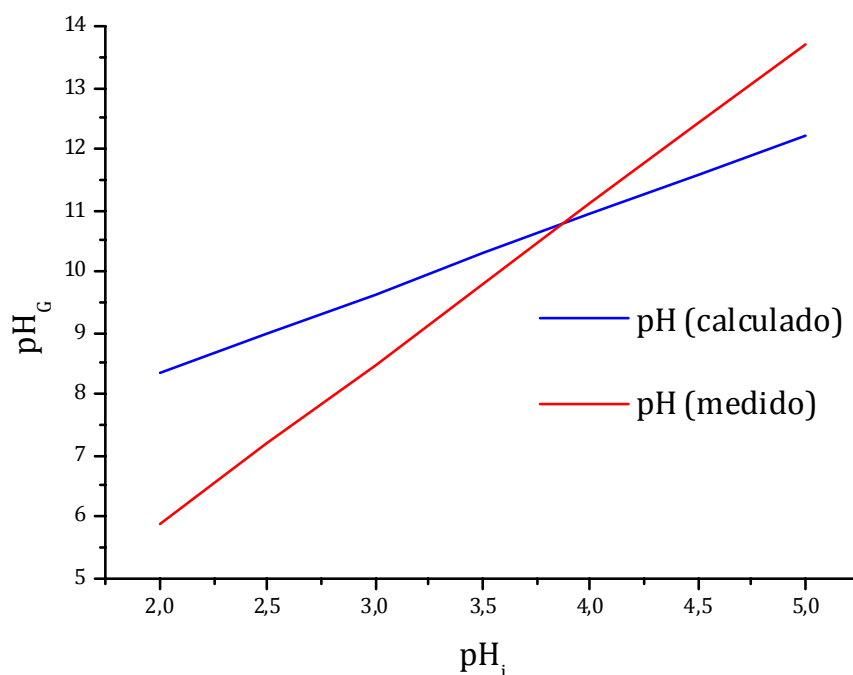


Figura 5.5.8. Diferencia entre las correlaciones lineales del pH interno en función del pH inicial para las medidas realizadas en los geles y los cálculos de pH interno

Presentamos una última observación a la luz de la variación de los espectros de absorción de la disolución sobrenadante. Anteriormente (ver apartado 4.4.4), habíamos señalado el hecho de que una vez alcanzado el equilibrio, el sobrenadante presentaba una notable disminución en la concentración de sonda, lo que revela la difusión o la inmovilización de ésta en el hidrogel.

Para analizar estas variaciones, proponemos un método basado en la ley de Beer-Lambert. En cualquier punto del espectro de absorción se cumple: $A(\lambda) = \varepsilon(\lambda) \cdot C \cdot l$

Si integramos los espectros dentro de un intervalo de longitudes de onda:

$$\underbrace{\int_{\lambda_1}^{\lambda_2} A(\lambda) d\lambda}_{I_a} = C \cdot l \cdot \underbrace{\int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \varepsilon(\lambda) d\lambda}_{I_e} \quad [5.2]$$

Como el coeficiente de extinción molar es característico de la sonda en unas mismas condiciones (pH, temperatura, disolvente,...), si éstas no varían, entonces para determinar la concentración desconocida, la expresión anterior se reduce a:

$$\frac{Ia_1}{C_1} = \frac{Ia_2}{C_2} \Rightarrow C_2 = C_1 \frac{Ia_2}{Ia_1} \quad [5.3]$$

De modo que podemos integrar los dos espectros de absorción entre las mismas longitudes de onda y multiplicar el cociente de absorbancias integradas por la concentración inicial (conocida) de sonda en la disolución para estimar la concentración desconocida.

La única objeción que podemos plantear a este método es que el pH en la disolución tiene una variación considerable y por consiguiente no podemos suponer que la absorción en términos del coeficiente de extinción molar mantenga su forma. Para poder aplicar esta fórmula, la integral del segundo miembro no debe variar. Así que debemos comparar espectros de absorbancias obtenidas al mismo valor de pH. Por ese motivo, no se comparan los espectros del sobrenadante antes y después de alcanzar el equilibrio, sino comparando los espectros del sobrenadante en equilibrio con la absorción de la sonda a un pH similar al que la disolución ha alcanzado después del equilibrio de hinchamiento del gel. La tabla 5.5.6 presenta los cálculos realizados a partir de los espectros del sobrenadante (presentados anteriormente en el apartado 4.4.4) y de otras muestras de la sonda en disolución. El espectro de absorbancias integrado (I_a) se acompaña del error asociado a la integración numérica.

Hidrogeles PVI40(2)			Disoluciones de referencia			
	pH_s	I_a (gel)		pH	I_a (ref)	C_{SNARF} (μM)
G1-23	3,47	1,81490±0,00011	1	3,13	5,5106±0,0003	2,14
G2-32	6,00	1,28281±0,00008	2	6,08	11,4091±0,0006	4,00
G3-27	4,65	0,98914±0,00007	3	4,64	6,7780±0,0003	2,17
G4-24	3,68	1,23100±0,00008	4	3,88	5,8911±0,0003	2,15
G5-26	4,08	1,03622±0,00007	5	4,09	10,8342±0,0006	4,03
GL	6,82	0,82210±0,00006	6	6,96	29,325±0,001	11,01
GH	6,31	2,4078±0,0001	2	6,08	11,4091±0,0006	4,00
GA	5,61	3,4634±0,0002	7	5,23	6,8359±0,0004	2,32

Tabla 5.5.6. Absorbancias y concentraciones de las muestras de sobrenadante del hinchamiento de los hidrogeles comparadas con disoluciones similares que sólo contienen la sonda fluorescente C-SNARF-1

Pero además de poder calcular la concentración de sonda en el sobrenadante, podemos estimar, por tanto, cuál es la concentración de la sonda en el interior del hidrogel. Haciendo un balance de masa de la sonda, tenemos que:

$$n_0 = n_S + n_G \quad [5.4]$$

$$C_0 \cdot V_T = C_{SS} \cdot \sigma \cdot V_T + C_{SG} \cdot (1 - \sigma)V_T \quad [5.5]$$

De donde obtenemos:

$$C_{SG} = \frac{C_0 - \sigma C_{SS}}{1 - \sigma} \quad [5.6]$$

En la tabla 5.5.7 se muestran los resultados de los cálculos anteriores para la concentración de sonda en el sobrenadante (C_{SS}), a partir de la ecuación [5.3], así como la concentración estimada en el interior del hidrogel (C_{SG}). Además de las concentraciones, comparamos las disminuciones porcentuales en los máximos de absorbancia de los espectros del sobrenadante (ver apartado 4.4.4) con la disminución porcentual de la concentración en el sobrenadante

	C_0 (μM)	C_{SS} (μM)	C_{SG} (μM)	$\Delta A/A$ (%)	$\Delta C/C$ (%)
G1-23	2,84	0,71	135	-80,19%	-75,18%
G2-32	2,84	0,45	266	-83,45%	-84,16%
G3-27	2,46	0,32	170	-89,55%	-87,13%
G4-24	3,59	0,45	202	-88,82%	-87,49%
G5-26	2,95	0,39	181	-90,01%	-86,93%
GL	2,06	0,31	334	-90,07%	-85,02%
GH	14,05	0,84	2172	-92,68%	-93,99%
GA	2,07	1,18	69	-43,36%	-43,22%

Tabla 5.5.7. Absorbancias y concentraciones de las muestras de sobrenadante del comparadas con disoluciones similares que sólo contienen la sonda C-SNARF-1

Con estos cálculos podemos concluir que, en general, durante el hinchamiento del hidrogel, hay una fuerte tendencia de la sonda a abandonar la disolución para difundir en el interior del gel o quedar inmovilizada, lo que se corresponde con la observación de una intensa coloración de los geles, si bien la intensidad de cuentas en los decaimientos no hacía sospechar que las concentraciones de sonda en el hidrogel fueran tan elevadas como se indica en la tabla.

Además de las posibles interacciones entre la sonda y el hidrogel, teniendo en cuenta las altas concentraciones calculadas en el interior del gel, sería plausible afirmar que la reducción del tiempo de vida de la sonda puede deberse, en parte, a un proceso de transferencia de energía entre moléculas de la misma especie (homotransferencia).

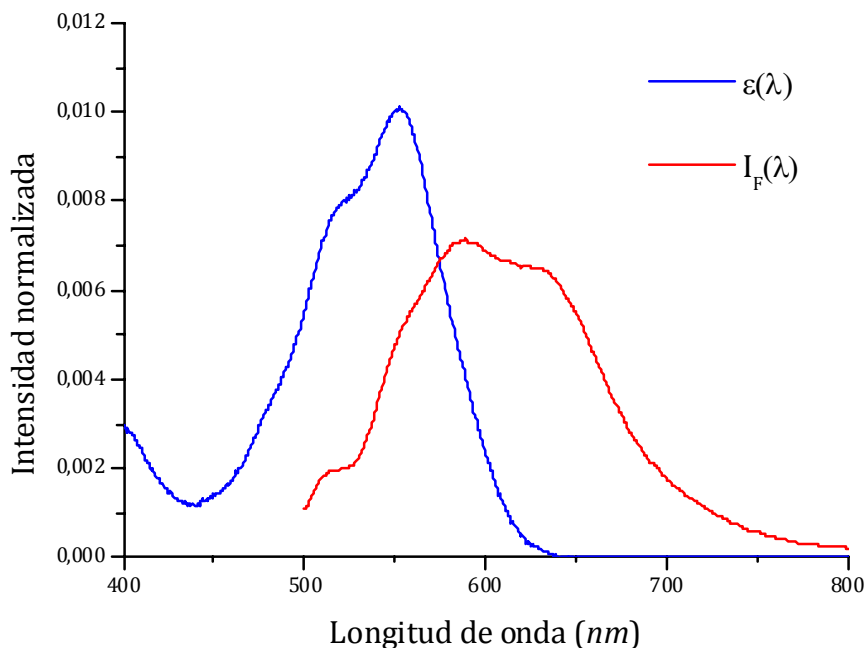


Figura 5.5.9. Espectros normalizados de absorción y emisión de fluorescencia de la sonda fluorescente C-SNARF-1 (pH=6,90)

Comparando los espectros normalizados de absorción y emisión (ver figura 5.5.9), podemos ver que existe un solapamiento notable cuando la sonda se excita a 486nm. Para comprobar la posibilidad de homotransferencia en la sonda C-SNARF-1, debemos calcular los parámetros de transferencia de energía: el **radio de Förster** (distancia a la que la eficiencia de transferencia es del 50%) y la **concentración crítica** (a la cual los pares donador-aceptor se encuentran a la distancia del radio de Förster).

El radio de Förster ^[6] se calcula como:

$$R_0^6 = \left(\frac{9000 \cdot \ln 10}{128 \pi^5 n^4 N_A} \right) \kappa^2 \Phi \cdot J(\lambda) \quad [5.7]$$

Donde n es el índice de refracción del medio, N_A es el número de Avogadro, κ^2 es un factor orientacional, que en disolución tiene un valor $\kappa^2 = 2/3$, Φ es el rendimiento

cuántico del donador y $J(\lambda)$ es la integral de solapamiento, que se obtiene a partir de la emisión normalizada del donador y de la absorción del aceptor:

$$J(\lambda) = \int_0^{\infty} F_D(\lambda) \cdot \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad [5.8]$$

Para el caso en que el donador y el aceptor son el mismo fluoróforo (homotransferencia), el espectro de absorción que se usa es el del donador. Si suponemos que el rendimiento cuántico de la sonda a pH=6,9 es el calculado en el apartado 5.2.4 para pH=6 ($\Phi = 0,63$), entonces:

Integral de solapamiento: $J(\lambda) = 9,23359 \cdot 10^{-14} \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^3$

Radio de Förster: $R_{D0} = 47 \text{ Å}$

Concentración crítica: $C_{D0} = 4,31 \text{ mM}$

Si reescribimos la concentración de sonda en el interior del gel como una concentración reducida ($\gamma = C/C_{D0}$), tenemos:

	$C_0 (\mu\text{M})$	$C_{SG} (\mu\text{M})$	γ
G1-23	2,84	135	0,031
G2-32	2,84	266	0,062
G3-27	2,46	170	0,039
G4-24	3,59	202	0,047
G5-26	2,95	181	0,042
GL	2,06	334	0,078
GH	14,05	2172	0,504
GA	2,07	69	0,016

Tabla 5.5.7. Concentraciones reducidas de las muestras de sobrenadante

Se considera que un radio de Förster próximo a 57 Å indica la presencia de homotransferencia [6]. Las concentraciones reducidas de nuestras muestras tienen un promedio de $\gamma \sim 0,05$, por lo que no se puede descartar que exista una contribución de homotransferencia de energía como proceso de quenching, lo que ayuda a explicar la disminución del tiempo de vida de la sonda en el interior del hidrogel.

*la manera de terminar un poema como este
es quedarse de pronto callado.*

Charles Bukowski

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES

Se han llegado a *reproducir satisfactoriamente* los resultados publicados por el equipo de investigación de la UNED, estableciendo además que: *a partir de la segunda semana se ha alcanzado prácticamente el equilibrio de hinchamiento*. Se ha observado la *tendencia de la sonda a difundir o quedar inmovilizada por el hidrogel*, de manera que resulta necesario medir los espectros de absorción de la disolución en que se sumergen los geles, antes y después de alcanzarse el equilibrio de hinchamiento. A partir de esta información, *se puede estimar la concentración de la sonda en el interior del hidrogel*, partiendo de una expresión que se ha derivado para tal efecto.

Sin embargo, no ha sido posible determinar de manera clara y unívoca el pH en el interior de los geles de polivinilimidazol a través de los tiempos de vida de fluorescencia de la sonda C-SNARF-1, si bien las medidas conseguidas hacen pensar que *el método es válido y que sería deseable encontrar una sonda alternativa* que preferentemente: tuviera un *mayor pK_a* para tener más resolución en el rango $7 \leq \text{pH} \leq 10$ y que tuviera una *variación uniforme de sus propiedades fotofísicas con los cambios de pH*.

La sonda C-SNARF-1 tiene una variación no uniforme de sus propiedades con el pH, lo que dificulta determinar claramente el pH interno. Además, los valores obtenidos por medidas con resolución temporal subestiman los valores predichos por el modelo teórico. El uso de una sonda alternativa permitiría concluir si sólo es debido a esta sonda o al hecho de que el mismo modelo sobreestima el pH interno.

Es necesario subrayar el hecho de que trabajando con disoluciones que inicialmente tienen un $\text{pH}=2$ o superior, *nos encontramos en el límite de fuerza iónica*, por encima del cual es necesario trabajar con actividades en lugar de concentraciones.

Con respecto al equipo de medición empleado, se recomienda utilizar la fuente **PLS-8-2-372** entre 5MHz y 20MHz, seleccionando una intensidad igual o superior al 90% con el potenciómetro de intensidad de la fuente **PDL 800-B**. Por otra parte, los resultados óptimos de la fuente **PLS-8-2-218** se consiguen entre 20MHz y 40MHz, seleccionando un valor del potenciómetro de intensidad igual o superior al 85%. Esto permite calcular con gran precisión tiempos de vida de fluorescencia comprendidos entre 0,1ns y 10ns.

Las medidas de tiempos de vida de fluorescencia de la Rhodamina B (estándar de referencia) y de la fluoresceína nos permiten afirmar que *el fluorímetro es capaz de medir los tiempos de vida con muy buena precisión y una gran repetitibilidad*.

El método de valoración espectrofotométrica propuesto para la caracterización fotofísica de las sondas fluorescentes resulta ser un método aproximado pero suficiente para *determinar experimentalmente el pK_a y detectar las posibles irregularidades de la sonda*. Además, se ha derivado una expresión para calcular la concentración óptima de cromóforo para la valoración.

El método propuesto para la caracterización de la sonda, previamente a su uso en la medida del pH interno, es válido y se recomienda obtener los espectros de absorción y emisión de la sonda, realizar la valoración espectrofotométrica y finalmente obtener los decaimientos para un rango amplio de pH.

*Retirado en la paz de estos desiertos,
con pocos, pero doctos libros juntos,
vivo en conversación con los difuntos,
y escucho con mis ojos a los muertos.*

Francisco de Quevedo

BIBLIOGRAFÍA

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y CONSTANTES

- [1] P.J. Mohr, B.N. Taylor; *Rev. Mod. Phys.* 77-1 (2005) 1-107.

OBRAS DE REFERENCIA

- [2] J. A. Dean (ed); *Lange's Handbook of Chemistry*, 15th ed., McGraw-Hill, New York, 1999.
- [3] P. Flory; *Principles of Polymer Chemistry*, Cornell University Press, Itaca, 1953.
- [4] Gillespie et al.; *Química*, Ed. Reverté, Barcelona, 1990.
- [5] A. Horta Zubiaga; *Introducción a la Termodinámica de Polímeros*, UNED, Madrid, 2004.
- [6] J.R. Lakowicz; *Principles of Fluorescence Spectroscopy* 2nd ed. Kluwer/Plenum Press, New York, 1999.
- [7] J.R. Lakowicz (ed.); *Topics in Fluorescence Spectroscopy (Vol. 4): Probe Design and Chemical Sensing*, Plenum Press, New York, 1994.
- [8] I.N. Levine ; *Espectroscopía Molecular* (1980) Páginas 100-127, y 333-338.
- [9] Ira N. Levine; *Fisicoquímica*, 4^a Ed, McGraw-Hill, New York, 1996.
- [10] J.E. Mark; *Physical Properties of Polymers handbook*, AIP Press, New York, cap. 28, 379-398
- [11] F. Peral Fernández; *Asociaciones Moleculares*, Cuad. de la UNED, 115, UNED, Madrid, 1992.
- [12] R.W. Sabnis; *Handbook of Acid-Base Indicators*, CRC Press, Boca Raton, 2008.

EQUILIBRIO QUÍMICO, pH y DISOLUCIONES TAMPÓN

- [13] R. P. Buck et al.; *Measurement of pH. Definition, standards, and procedures (IUPAC Recommendations 2002)*; *Pure Appl. Chem.* 74-11 (2002) 2169–2200.
- [14] A.K. Covington et al.; *Definition of pH scales, standard reference values, measurement of pH and related terminology (Recommendations 1984)*; *Pure Appl. Chem.* 57-3 (1985) 531—542.
- [15] R. M. Dawson, C. Elliot, W.H. Elliot, K.M. Jones; *Data for Biochemical Research*; 3rd ed., Oxford Science Publ., 1986.
- [16] P. Debye, E. Hückel, *Physikalische Zeitschrift* 24 (1923) 185–206.
- [17] R.N. Goldberg, N. Kishore, R.M. Lennen; *Thermodynamic Quantities for the Ionization Reactions of Buffers*; *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 31-2 (2002).
- [18] The International Association for the Properties of Water and Steam; *Release on the Ionization Constant of Water*, Lucerna, 2007.
- [19] R. de Levie; *The Henderson Approximation and the Mass Action Law of Guldberg and Waage*; *Chem. Educator* 7 (2002) 132-135.
- [20] R.A. Robinson, R.H. Stokes, *Electrolyte solutions, the measurement and interpretation of conductance, chemical potential, and diffusion in solutions of simple electrolytes*, 2nd ed., rev. London, Butterworths, 1968.
- [21] S.P.L. Sorensen, *Enzymstudien. II, Über die Messung und die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration bei enzymatischen Prozessen*, *Biochem. Zeitschr.* 21 (1909) 131–304.

GELES Y POLÍMEROS

- [22] V.V. Annenkov, E.N. Danilovtseva, H. Tenhu, V. Aseyev, S.P. Hirvonen, A.I. Mikhaleva; *Copolymers of 1-vinylimidazole and (meth)acrylic acid: Synthesis and polyelectrolyte properties*, *Eur. Pol. J.* 40 (2004) 1027–1032.
- [23] S.G. Christensen, K. Thomsen; *Experimental measurement and modeling of the distribution of solvent and ions between an aqueous phase and an ion exchange resin*; *Fluid Phase Equilibria* 228–229 (2005) 247–260.
- [24] T. Çaykara, M. Doğmus, Ö. Kantoğlu; *Network Structure and Swelling–Shrinking Behaviors of pH Sensitive Poly(acrylamide-co-itaconic acid) Hydrogels*; *J. Pol. Sci. B*, 42 (2004) 2586–2594.
- [25] K. Dähnert, D. Huster; *Comparison of the Poisson–Boltzmann Model and the Donnan Equilibrium of a Polyelectrolyte in Salt Solution*; *J. Coll. Int. Sci.* 215 (1999) 131–139.

- [26] V. Ermatchkov, L. Ninni, G. Maurer; *Thermodynamics of phase equilibrium for systems containing N-isopropyl acrylamide hydrogels; Fluid Phase Equilibria* 296 (2010) 140–148.
- [27] G. Hild; *Interpretation of equilibrium swelling data on model networks using affine and 'phantom' network models, Polymer* 38-13 (1997) 3279-3293.
- [28] H. H. Hooper, et al., *Macromolecules*, **23**, 1096 (1990).
- [29] A. Horta, M.J. Molina, M.R. Gómez-Antón, I.F. Piérola; *The pH Inside a pH-Sensitive Gel Swollen in Aqueous Salt Solutions: Poly(N-vinylimidazole); Macromolecules* 42 (2009) 1285-1292.
- [30] A. Horta, M.J. Molina, M.R. Gómez-Antón, I.F. Piérola; *The pH inside a Swollen Polyelctrolyte Gel: Poly(N-Vinylimidazole); J. Phys. Chem. B* 112 (2008) 10123-10129.
- [31] M. Huglin y M. Rehab, *Polymer*, **28**, 2200 (1987).
- [32] M. Huglin y M. Zakaria, *J. Appl. Polym. Sci.*, **31**, 457 (1986).
- [33] M. Kabiri-Badr, H. Cabezas Jr.; *A thermodynamic model for the phase behavior of salt-polymer aqueous two-phase systems; Fluid Phase Equilibria* 115 (1996) 39-58.
- [34] A. Katime et al., *Polymer International*, **40**, 281 (1996).
- [35] M. Koszykowska, M. Tokarek, S. Kucharski; *Synthesis and photochromic properties of poly[N-vinyl-2-(phenylazo)-imidazole] derivatives in the near UV range; Mat. Sci. Pol.* 27-3 (2009)
- [36] S. Lammertz, T. Grünfelder, L. Ninni, G. Maurer; *A model for the Gibbs energy of aqueous solutions of polyelectrolytes, Fluid Phase Equilibria* 280 (2009) 132–143.
- [37] P. Lee, *J. Control. Rel.*, **2**, 277 (1985).
- [38] G.S. Longo, M. Olvera de la Cruz, I. Szleifer; *Molecular Theory of Weak Polyelectrolyte Gels: The Role of pH and Salt Concentration; Macromolecules* 44 (2011) 147–158.
- [39] G. Maurer, J.M. Prausnitz; *Thermodynamics of phase equilibrium for systems containing gels; Fluid Phase Equilibria* 115 (1996) 13-133.
- [40] M.J. Molina, M.R. Gómez-Antón, I.F. Piérola; *Determination of the Parameters Controlling Swelling of Chemically Corsslinked pH-Sensitive Poly(N-Vinylimidazole) Hydrogels; J. Phys. Chem. B*, 112(2007) 12066-12074.
- [41] M.J. Molina, M.R. Gómez-Antón, I.F. Piérola; *pH-Dependence of the Swelling Capacity of Poly(N-vinylimidazole) Hydrogels; Macromol. Chem. Phys.* 203 (2002) 2075–2082.
- [42] I.E. Pacios, I.F. Piérola; *Discrimination of the Roles of Crosslinking Density and Morphology in the Swelling Behavior of Crosslinked Polymers: Poly(N-vinylimidazole) Hydrogels; J. Appl. Pol. Sci.* 112 (2009) 1579–1586.

- [43] I.E. Pacios, I.F. Piérola; *Importance of Postgel Reactions in Determining the Polymer Network Structure and Properties. Poly(N-vinylimidazole) Hydrogels; Macromolecules* 39 (2006) 4120-4127.
- [44] J. P. Queslel and J. E. Mark; *Molecular Interpretation of the Moduli of Elastomeric Polymer Networks of Known Structure; Adv. Pol. Sci.* 65, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 1984.
- [45] J. Thiel, G. Maurer; *Swelling equilibrium of poly acrylamide. gels in aqueous salt and polymer solutions; Fluid Phase Equilibria* 165 (1999) 225–260.
- [46] J. Valencia, I. F. Piérola; *Equilibrium swelling properties of poly(N-vinylimidazole-co-sodium-styrenesulfonate) hydrogels; Eur. Pol. J.* 37 (2001) 2345-2352.
- [47] A.I. Victorov; *Effect of morphology of a swollen ionomer gel on its salt uptake; Fluid Phase Equilibria* 241 (2006) 334–343.
- [48] O. Wichteler y D. Lim, *Nature*, **185**,117 (1960).

FLUORESCENCIA Y SONDAS FLUORESCENTES

- [49] L. Brand, B. Witholt; *Fluorescence Measurements. Methods in Enzymology* Vol. 11
- [50] C.D. Corredor; *Diseño, preparación, caracterización fotofísica y fotoquímica de indicadores luiminescentes para sensores de fibra óptica de pH/CO₂, O₂ y alcoholes/agua* (T. Doctoral), UCM, Madrid, 1994.
- [51] D Eisenberg, D. Crothers; *Physical Chemistry with Applications to the Life Sciences.* (1979) Benjamin (QUANTUM YIELD)
- [52] M. Fischer and J. Georges, *Chem. Phys. Lett.* 260 (1996), 115. (Rendimiento cuántico de la Rhodamina 6G en agua)
- [53] R.N. Goldberg, N. Kishore, R.M. Lennen; *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 2002, 31-2.
- [54] L. Kreja, M. Rębarz, M. Wojdyła, W. Bała, P. Rycharski, P. Dalasiński, Z. Łukasiak; *The Photoluminescence Properties of Vinylcarbazole – Vinylimidazole Copolymer Thin Films; Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 485 (2008): 271–281.
- [55] A. Kurtz, R.S. Balaban; *Biophys. J.* **48**, 1985, pp. 499-508 (DHPN)
- [56] L. Lindqvist; *A flash photolysis study of fluorescein; Arkiv för Kemi* 16-8 (1960) 79-138.
- [57] W.R. Laws, L. Brand, *Analysis of Two-state Excited-state Reactions. The fluorescence Decay of 2-Naphtol, J. Phys. Chem.* 83-7 (1979) 795-802.
- [58] M. Melouna, S. Bordovská, T. Syrový, A. Vrána; *Tutorial on a chemical model building by least-squares non-linear regression of multiwavelength spectrophotometric pH-titration data; Anal. Chim. Acta* 580 (2006) 107–121.

- [59] K. Willaert, Y. Engelborghs; The quenching of tryptophan fluorescence by protonated and unprotonated imidazole; *Eur. Biophys. J.* 20 (1991):177-182.
- [60] V. Zanker, W. Peter; Die prototropen Formen des Fluoresceins,

INSTRUMENTACIÓN

- [61] J.N. Demas; *Excited Lifetime Measurements*, Academic Press, New York, 1983.
- [62] M. Ware, A. Migdall, S.V. Polyakov; *Calibrating photon-counting detectors to high accuracy: background and deadtime issues*; *J. Mod. Opt.* Vol. 54, Nos. 2-3, 2007, 361-372.
- [63] P. Kapusta, M. Wahl, A. Benda, M. Hof, J. Enderlein; *Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy*; *J. Fluoresc.* 17 (2007): 43-48.

INFORMACIÓN TÉCNICA DE PRODUCTO

- [64] Acton / Princeton Instruments; *Spectroscopy* (Brochure)
- [65] Acton Research Corporation; *Gratings Information* (Brochure)
- [66] Acton Research Corporation; *Acton Standard Series of Monochromators and Spectrographs*, Acton Standard Series Rev. N1, Princeton Instruments
- [67] Acton Research Corporation; *SpectraPro-150. Operating Instructions*
- [68] Acton Research Corporation; *SpectraPro® Monochromator. Control Software for Windows. Version 2.0*
- [69] CAEN International; *Models N107/N108 Single and dual delay units* (Brochure)
- [70] Hamamatsu Photonics K.K.; *Photomultiplier Tubes. Basics and Applications*. 3rd ed., 2006
- [71] Hamamatsu Photonics K.K.; *Xenon Lamps* (Brochure)
- [72] Hameg Instruments GmbH; *Osciloscopio analógico de 35 MHz HM303-6*, Mainhausen,
- [73] Panreac S.A.U.; *Catálogo General. Reactivos para Análisis y Productos para Química Fina*, 2011.
- [74] Perkin-Elmer; *Lambda 12, 14, 14-P Operation Manual*, 1995.
- [75] Perkin-Elmer; *UV Winlab Software Manual*, 1996.
- [76] PicoQuant GmbH; *PDL 800-B. Picosecond Pulsed Diode Laser Driver* (Brochure)
- [77] PicoQuant GmbH; *PLS Series. Sub-nanosecond pulsed LEDs for PDL 800-B/808/828* (Brochure)

- [78] PicoQuant GmbH; *PMA 165 / 182 /185. Photomultiplier Detector Assembly* (Brochure)
- [79] PicoQuant GmbH; *TimeHarp 200* (Brochure)
- [80] PicoQuant GmbH; *FluoFit. Global Fluorescence Decay Data Analysis Software*. User's Manual and Technical Data. Version 4.2.
- [81] PicoQuant GmbH; *TimeHarp 200. Time Measurement Histogram Accumulating Real-time Processor. PCI-Board for Time-Correlated Single Photon Counting*. User's Manual and Technical Data. Software Version 6.0.
- [82] Schott Instruments; *BlueLine pH-Einstabmessketten* (Brochure)
- [83] Schott Instruments; *Laboratory pH meters, conductivity meters* (Brochure)
- [84] SI Analytics GmbH; *Laborkatalog*, Mainz.

NOTAS TÉCNICAS

- [85] M. Allen; *Stray Light – Measurement and Effect on Performance in UV-Visible Spectrophotometry; Technical Note 51170* (ThermoScientific)
- [86] Jobin Yvon – Horiba; *A Guide to Recording Fluorescence Quantum Yields*, Middlesex.
- [87] P. Kapusta, *Sensitivity of FluoTime Series Lifetime Spectrometers, Technical Note*, PicoQuant GmbH, Berlin, 2002.
- [88] J. Peters; *Titration, eine unverzichtbare Methode zur Gehaltsbestimmung im modernen Labor*
- [89] SI-Analytics GmbH, Mainz, 2010.
- [90] L. Sooväli, E.I. Rõõm, A. Kütt, I. Kaljurand, I. Leito; *Uncertainty sources in UV-Vis spectrophotometric measurement; Accred Qual Assur* (2006) 11: 246–255.
 - a. Sound, H. Becker; *Kalibrierung als Basis der pH-Messung; Labor-Praxis* Juli/August 2010 (SI Analytics)
- [91] G. Tauber; *Industrielle pH-Messung. Beiträge der Diffusionspotenziale zur Messunsicherheit; Technisches Messen* 76-6 (2009)
- [92] M. Wahl, *Time-Correlated Photon Counting, Technical Note*, PicoQuant GmbH, Berlin, 2002.

MÉTODOS NUMÉRICOS

- [93] Bevington, P.R. and Robinson, D.K.; *Data Reduction and Error Analysis for the Physical Sciences*, 3rd Ed., McGraw-Hill, New York, 2002
- [94] H.H. Madden; *Comments on the Savitzky-Golay Convolution Method for Least-Squares Fit Smoothing and Differentiation of Digital Data*; *Anal. Chem.* 50-9, (1978): 1383-1386.
- [95] Meyer, S.L.; *Data Analysis for Scientists and Engineers*, Wiley, New York, 1975.
- [96] *Numerical Recipes in C: The Art of Scientific Computing* (cap.4, pp. 650-655), Cambridge U. Press., Cambridge, 1988.
- [97] R. Walpole, R. Myers, K. Ye; *Probability and Statistics for Engineers and Scientists*. Pearson Education, 2002.
- [98] F. J. Richards; *J. Experimental Botany*, 10-39 (1959): 290-300.
- [99] A. Tsoularis; *Analysis of Logistic Growth Models*, *Res. Lett. Inf. Math. Sci.* 2 (2001): 23-46.

SITIOS WEB DE INTERÉS

SI Analytics GmbH

(<http://www.si-analytics.com/downloads/produkt-und-anwendungs-informationen/messgeraete.html>)

www.hameg.com

Jobin Yvon – Horiba

www.jyhoriba.co.uk

(Disponible en: <http://www.panreac.es/>)

Preparación buffers

<http://www.ou.edu/research/electron/bmz5364/buffers.html>

(www.analytik-news.de)

APÉNDICES

A.1. MONTAJE DEL FLUORÍMETRO DE RESOLUCIÓN TEMPORAL

Este apéndice es una guía visual a los diferentes elementos descritos en el trabajo y su finalidad es poder identificar aquellas partes que el experimentador necesita manejar a la hora de realizar medidas de tiempos de vida de fluorescencia con este dispositivo.

Recordamos en primer lugar el esquema general de interconexión, previamente descrito en el apartado 3.1.2.5.

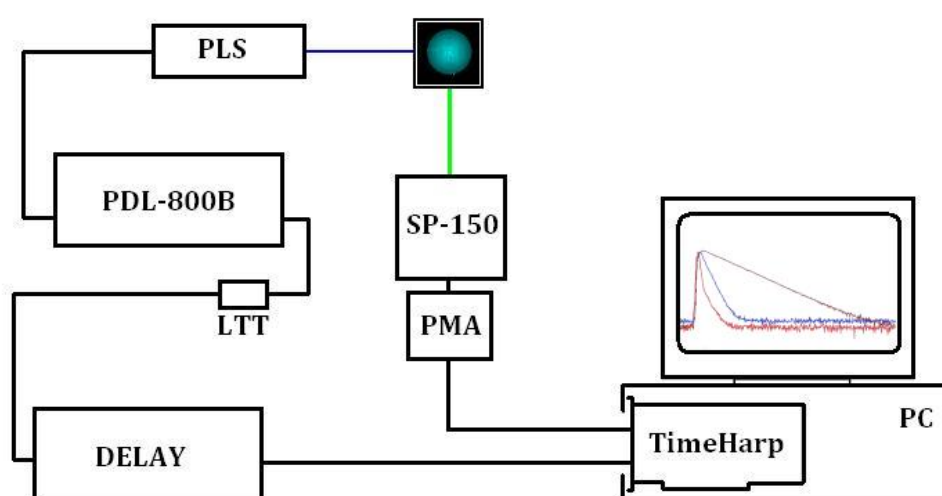


Figura A.1.1. Esquema general del fluorímetro de resolución temporal

La fuente de excitación PDL 800-B tiene dividido su panel frontal en cuatro partes: (A) el panel de conexión del diodo LED/láser; (B) el panel de trigger; (C) el potenciómetro de intensidad y (D) el panel de selección de frecuencias con la salida de la señal a la que está conectado el elemento LTT (E), que a su vez está conectado al delay externo N107 (F).



Figura A.1.2. Fuente de pulsación PDL 800-B y delay externo N107

La fuente PLS (A) se acopla a la cámara de muestras mediante una armadura (housing) formada por un tubo cilíndrico atornillado a la cámara (B), en cuyo interior se desliza el cilindro (C) en el que se introduce la fuente PLS.



Figura A.1.3. Fuente PLS y armadura de acoplamiento

En su interior, la cámara de muestras tiene una óptica preparada para la detección a 90° y un portamuestras preparado para alojar cubetas de cuarzo o metacrilato de 10mm de paso óptico.

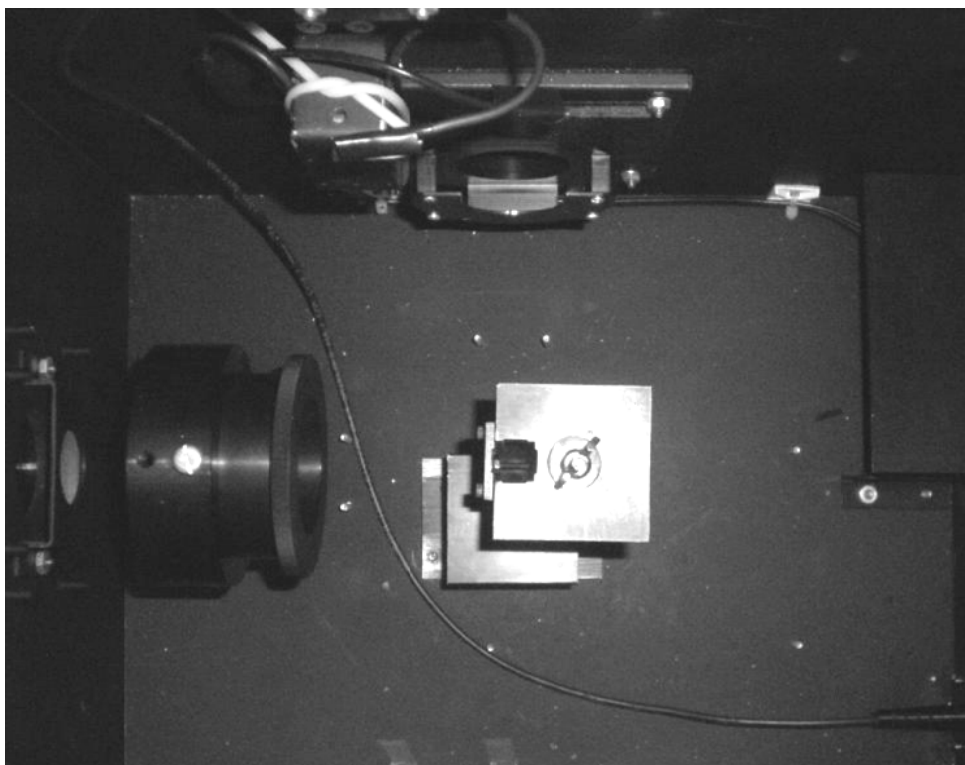


Figura A.1.4. Interior de la cámara de muestras

El monocromador está situado a la salida de la cámara de muestras y a su vez conectado al detector, de modo que la selección de longitudes de onda se puede realizar sólo en la emisión. No se ha dispuesto ninguna etapa que aumente la monocromaticidad del haz que proviene de la fuente PLS.

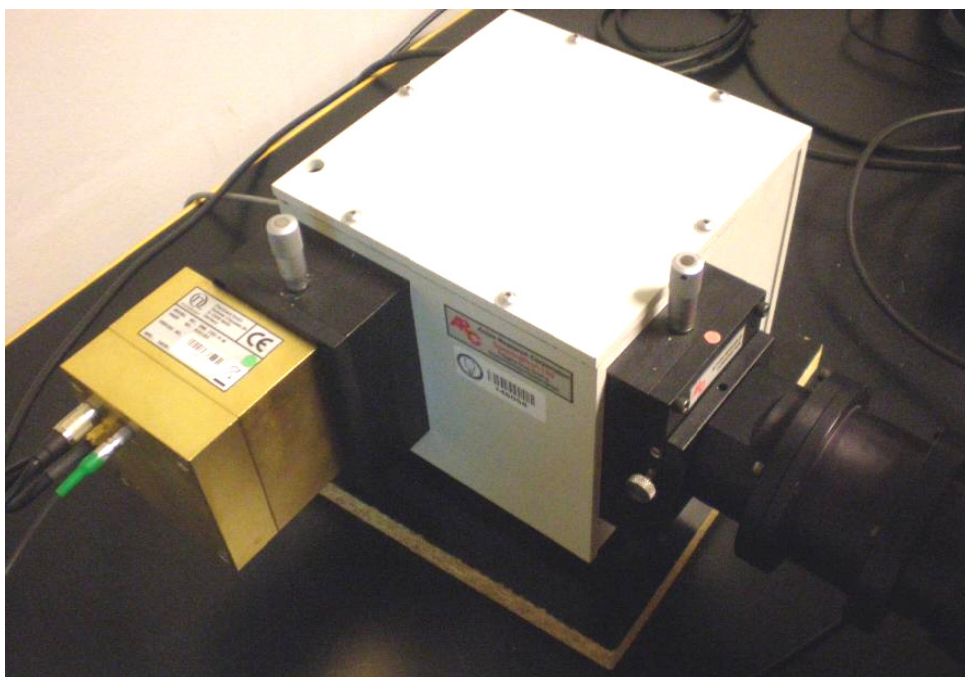


Figura A.1.5. Monocromador y detector (PMT)

A.2. INDICACIONES DE USO DEL FLUORÍMETRO DE RESOLUCIÓN TEMPORAL

Este apéndice quiere servir como guía de referencia rápida para el investigador que necesite poder medir tiempos de vida de fluorescencia haciendo uso del fluorímetro empleado en el presente trabajo. Los datos que aquí se presentan se encuentran en los catálogos del fabricante o han sido obtenidos en el laboratorio, en el marco de este trabajo. Los ajustes del equipo son siempre variables, pudiendo modificar cada experimentador los parámetros para una mejor adecuación a las muestras que desee caracterizar. También los procedimientos gráficos y las rutinas de cálculo pueden realizarse de acuerdo con otros criterios, si bien la solución que aquí proponemos está basada en las utilidades básicas proporcionadas por el fabricante.

A.2.1. Elección de la fuente de excitación

El primer paso consiste en seleccionar la fuente de excitación más adecuada. En la actualidad, el fluorímetro dispone de dos fuentes LED de excitación, que permiten la excitación selectiva en torno a una longitud de onda característica. Si la sonda fluorescente que se está utilizando no puede excitarse en ninguna de las longitudes de onda especificadas, entonces habrá que recurrir al fluorímetro FLS900CDT, de Edinburgh Analytical Instruments, que permite excitar con hidrógeno o nitrógeno (la frecuencia de pulsación que se puede conseguir en condiciones habituales es inferior a 50kHz).

	<i>Frecuencia</i>	λ_{MAX}	<i>Ancho espectral ($\Delta = FWHM$)</i>	
PLS-8-2-372	10 MHz	341nm	14nm	335nm – 349nm
	10 MHz	486nm	18nm	479nm – 497nm
PLS-8-2-218	20 MHz	486nm	29nm	477nm – 506nm

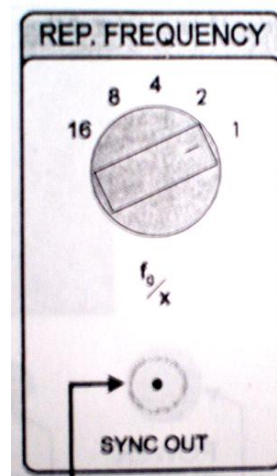
Tabla A.2.1. Ancho espectral (Δ) de las fuentes de excitación

La fuente de excitación de pulsos PDL 800-B (PicoQuant GmbH) tiene un generador que permite la excitación a 5 frecuencias distintas. Para seleccionar la frecuencia deseada, situar el potenciómetro en la posición indicada por el divisor de frecuencia.

Hay que tener en cuenta que un decaimiento exponencial necesita un tiempo cinco veces superior al tiempo de vida para haber decaído más de un 99%. Por tanto, si un fluoróforo tiene una componente larga, debemos buscar una ventana de tiempos adecuada. En la práctica, el tiempo de vida máximo que podemos medir a una determinada frecuencia es: $5\tau_{MAX} \leq 1/f$.

Potenciómetro (f_0/x)	Frecuencia (MHz)	Ω (ns)	τ_{MAX} (ns)
1	40	25	5
2	20	50	10
4	10	100	20
8	5	200	40
16	2,5	400	80

Tabla A.2.2. Frecuencias disponibles en la fuente PDL 800-B y características temporales



A continuación, es preciso ajustar la ventana de tiempos de los eventos del detector para que sea registrada convenientemente por la tarjeta de adquisición de datos TimeHarp 200. Para ello, hay que elegir un valor de delay externo (N107, CAEN International) y una resolución para ajustar el eje de tiempos y poder ver el decaimiento completo. La tabla A.2.3 recoge los valores de los diferentes parámetros en función de la frecuencia elegida.

PDL 800-B		TimeHarp 200		PLS-8-2-372		PLS-8-2-218	
(f_0/x)	Frecuencia	R	Ω_{real}	δ_{opt}	I _{Potenc}	δ_{opt}	I _{Potenc}
1	40MHz	39ps	112ns – 137ns	21ns	N.O.	22ns	≥85%
2	20MHz	39ps	87ns – 137ns	20ns	≥90%	22ns	≥85%
4	10MHz	39ps	37ns – 137ns	17ns	≥90%	18ns	≥90%
8	5MHz	78ps	97ns – 297ns	15ns	≥90%	10ns	N.O.
16	2,5MHz	156ps	215ns – 615ns	14ns	N.O.	6ns	N.O.

Tabla A.2.3. Resumen de los parámetros óptimos para el módulo **PDL 800-B** con las fuentes **PLS-8-2-372** (341nm) y **PLS-8-2-218** (486nm) y el software **TimeHarp 200**

Finalmente, de modo orientativo, ofrecemos las curvas obtenidas con el conteo promedio del detector ante un blanco de LUDOX para comprobar la eficiencia de las lámparas en función de la frecuencia y de la intensidad porcentual del potenciómetro de la fuente PDL 800-B.

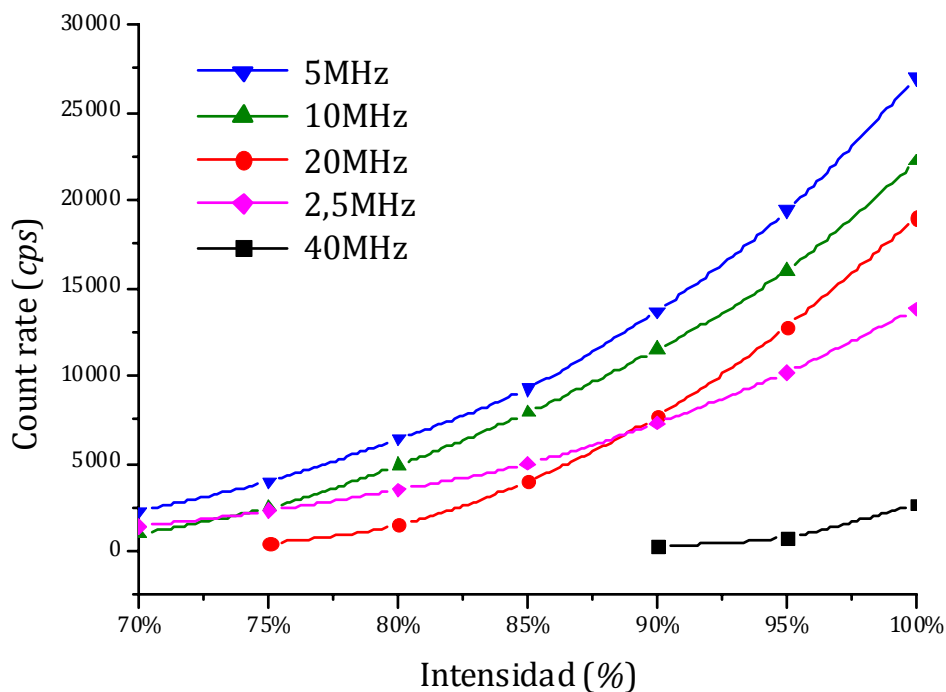


Figura A.2.1. Conteo promedio de la fuente PLS-8-2-372 (341nm)

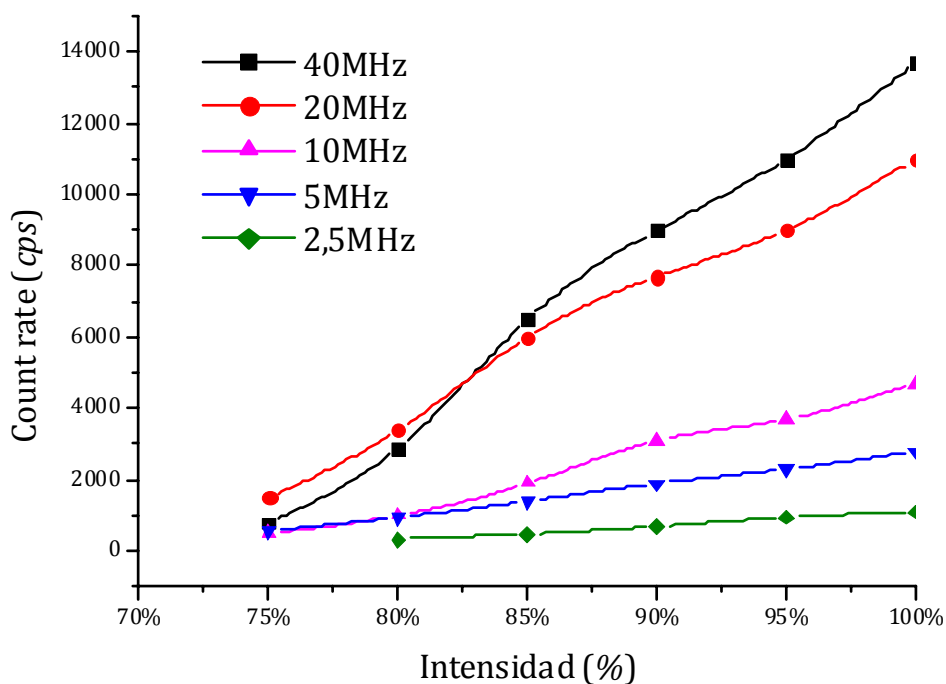


Figura A.2.2. Conteo promedio de la fuente PLS-8-2-218 (486nm)

A.2.2. Pasos para obtener los decaimientos

Los pasos básicos para obtener un decaimiento se resumen en tres etapas: ajuste del equipo, ajuste de los parámetros y estabilización de la señal y en tercer lugar, la medida del decaimiento.

Para el ajuste del equipo, se recomienda consultar las tablas del apartado anterior y elegir los valores apropiados. Después de esto:

- 1) Encender todos los dispositivos (PDL 800-B, monocromador, PC).
- 2) Conectar la fuente LED a la unidad PDL 800-B.
- 3) Seleccionar el disparo interno (Trigger=INT) para la sincronización de la señal.
- 4) Ajustar la frecuencia con el potenciómetro (Tabla A.2.3)
- 5) Seleccionar en la unidad CAEN N107 el delay adecuado (Tabla A.2.3)

Después, hay que ajustar el resto de parámetros en la aplicación de TimeHarp 200 y comprobar que la lámpara se ha estabilizado y que el ancho del pulso es adecuado:

- 1) Abrir la aplicación TimeHarp
- 2) Ajustar los parámetros de control del software (Tabla A.2.3).
- 3) Utilizar los modos INT/OSC para comprobar las señales.
- 4) Comprobar en cualquiera de los canales la señal del detector.
- 5) Obtener el decaimiento de la lámpara en cualquiera de los canales.
- 6) Dejar transcurrir unos 30 minutos antes de comenzar las medidas.
- 7) Comprobar el decaimiento de la lámpara en cualquiera de los canales.
- 8) Poner a cero todos los canales de medidas y reajustar los parámetros de control, si fuera necesario

Finalmente, puede llevarse a cabo la medida de los decaimientos, asignando a la lámpara un canal y otro a la muestra. Si se selecciona otro canal, pueden almacenarse varios decaimientos dentro del mismo archivo. Una vez terminadas las medidas, éstas se pueden guardar como un archivo con extensión *.THD, reconocible por los programas FluoPlot y FluoFit (PicoQuant GmbH). Es posible guardar las medidas en formato ASCII haciendo clic con el botón derecho sobre la ventana gráfica del programa TimeHarp 200.

A.2.3. Pasos para obtener los tiempos de vida de fluorescencia

Una vez obtenidos los decaimientos con el programa TimeHarp, para analizar los decaimientos y obtener los tiempos de vida hay que abrir la aplicación FluoFit. Los pasos a dar son los siguientes:

- 1) Abrir el archivo *.THD que contiene los decaimientos.
- 2) Seleccionar el canal que contiene el perfil de excitación (IRF).
- 3) Seleccionar el canal que contiene el decaimiento de la muestra (Decay).
- 4) Seleccionar el modelo de decaimiento al que ajustar a través de la ventana desplegable.
- 5) Seleccionar el número de tiempos de vida y de parámetros adicionales. Estos se activan en función del modelo de decaimiento previamente seleccionado.
- 6) Poner a cero todos los valores iniciales o introducir una estimación inicial de los parámetros (opcional).
- 7) Seleccionar el intervalo de tiempos de ajuste para la lámpara con las barras de desplazamiento vertical. Encima de la ventana gráfica hay una ventana que permite elegir cambiar la ventana de tiempos de la lámpara, la muestra, o ambas a simultáneamente.
- 8) Del mismo modo, seleccionar el intervalo de tiempos de ajuste para la muestra.
- 9) Iniciar el proceso iterativo.
- 10) Reajustar los intervalos, los parámetros o el modelo, si fuera necesario. Además del valor del parámetro Chi-cuadrado y de los residuos, debe comprobarse la función de autocorrelación, accesible desde el Menú <Tools> de la barra de herramientas.

Seleccionar la opción <Print results> para obtener un informe completo de resultados. Este informe puede guardarse o imprimirse. También es posible guardar el informe en formato ASCII, haciendo clic con el botón derecho sobre la ventana del informe de resultados.

A.3. PROTOCOLO DE VALORACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA

En el capítulo dedicado a la metodología experimental ya se desarrollaron los principios de la valoración espectrofotométrica. En este apéndice, y a modo de complemento, se presenta el protocolo particular empleado en este trabajo para obtener las curvas de absorbancia durante una valoración de cromóforo disuelto en una disolución ácida (HCl, pH~1) con NaOH (pH~12).

En nuestro caso, no disponíamos de células especiales que facilitasen una rápida medida in situ. De manera que para acoplar estas dos técnicas, proponemos el siguiente método:

- Medir el pH y la temperatura de la mezcla inicial de HCl y cromóforo.
- Añadir un volumen de NaOH.
- Extraer con una pipeta una alícuota para llenar una célula.
- Medir la absorbancia (tomar el promedio de al menos 3 medidas).
- Devolver con una pipeta el contenido de la célula a la disolución.
- Medir el pH y la temperatura para comprobar que no ha habido cambios.
- Seguir añadiendo un volumen de valorante y repetir las operaciones anteriores hasta que quede completada la curva de valoración.

En estos pasos, hay que ser especialmente cuidadoso para no alterar el volumen de la disolución valorada. Por eso se recomienda usar una pipeta a la hora de vaciar la célula de absorbancia. Como posteriormente la absorbancia debe ser corregida con la concentración, la pérdida de disolución reduce la concentración real de cromóforo y también el volumen total, dando lugar a un error sistemático que se propaga por todas las medidas.

Para completar el proceso en un tiempo razonable, en lugar de obtener espectros completos de absorción, se eligió un número determinado de longitudes de onda, correspondientes a los máximos de absorción de las diferentes formas prototrópicas de los cromóforos presentes en la disolución. De esta forma, en lugar de usar UV WinLab para controlar el espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 14P, se empleó un método manual accesible directamente desde el teclado del espectrofotómetro. A continuación se indica el funcionamiento del método manual.

Una vez encendido el espectrofotómetro, acceder al Menú de Métodos pulsando <METHOD>. A continuación se introduce con el teclado numérico el número del método que se desea emplear. El aparato dispone de una serie de métodos preprogramados cuyos parámetros pueden modificarse para ajustarlos a nuestras necesidades.

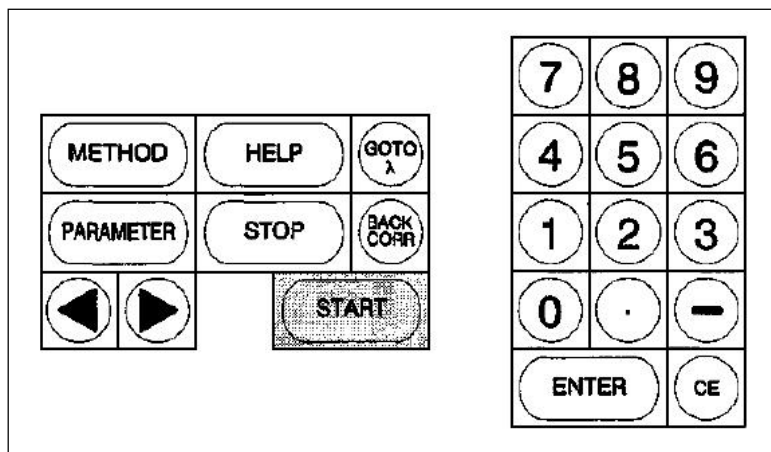


Figura A.3.1. Panel de control numérico del espectrofotómetro Lambda 14P

Para medir la absorbancia a un número discreto de longitudes de ondas, en el Menú de Métodos introducir "0003" con el teclado numérico y pulsar <ENTER>. Para modificar los valores predeterminados que se muestran en pantalla, utilizar el teclado numérico y las teclas <◀> y <▶> (para las longitudes de onda y sus factores de escala). Pulsar <PARAMETER> para ir recorriendo todos los parámetros del método seleccionado.

Una vez modificado el método, se puede salir a la ventana principal pulsando <STOP>. En la ventana principal, al pulsar <START> comenzará el método. Si se ha seleccionado en el método la corrección de base con un blanco (BACK CORR = YES), entonces efectuará el blanco para las longitudes de onda seleccionadas y después podrán introducirse las muestras.

Una vez se ha ejecutado el método, si no se ha indicado el número de muestras (SAMPLES/BATCH = 0), se podrán medir cuantas muestras se quiera. Si durante la valoración se quiere volver a medir usando una nueva corrección de la base con un blanco, basta con pulsar <STOP> y reiniciar el método pulsando <START>. Entonces tendremos que volver a medir el blanco y el método quedará listo de nuevo.

Haciendo varias pruebas, se observaron dos limitaciones a tener en cuenta:

Si se vuelve a efectuar una corrección de base durante la valoración, es posible que aparezca un salto entre los valores de la última medida antes de la corrección y la nueva medida. Se recomienda efectuar una única corrección de base antes de la valoración y mantener esa calibración durante todo el experimento.

Aunque la célula esté aparentemente limpia, las posibles imperfecciones en sus caras pueden hacer que una vez calibrado el método, la orientación de la célula en el detector dé lugar a medidas distintas de absorbancia que quedarían como datos no correlados. Se recomienda marcar una de las caras de la célula fuera de la zona de detección para medir siempre con la misma orientación. En la práctica funciona y elimina este error sistemático.

En la tabla adjunta se muestran los valores asignados a los parámetros del método preprogramado que se empleó en la valoración espectrofotométrica de las sondas fluorescentes. Para la fluoresceína se emplearon tres longitudes de onda, correspondientes a los máximos de absorción de las formas catiónica y neutra (437nm), aniónica (464nm) y dianiónica (491nm). En el caso del C-SNARF-1 se eligieron los máximos de la forma protonada (520nm y 550nm), el máximo de la forma deprotonada (577nm) y un punto pseudo-isosbético (535nm).

PROTOCOLO FLUORESCÉINA		PROTOCOLO C-SNARF-1	
Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
SLIT	1,0 nm	SLIT	1,0 nm
ORDINATE MODE	ABS	ORDINATE MODE	ABS
# WAVELENGTH	3	# WAVELENGTH	4
WAV. 1	437,0 nm	WAV. 1	520,0 nm
WAV. 2	464,0 nm	WAV. 2	535,0 nm
WAV. 3	491,0 nm	WAV. 3	550,0 nm
		WAV. 4	577,0 nm
FACTOR 1	1,0	FACTOR 1	1,0
FACTOR 2	1,0	FACTOR 2	1,0
FACTOR 3	1,0	FACTOR 3	1,0
		FACTOR 4	1,0
RESPONSE	0,5 S	RESPONSE	0,5 S
LAMP	UV+Vis	LAMP	UV+Vis
BACK CORR	YES	BACK CORR	YES
SAMPLES/BATCH	0	SAMPLES/BATCH	0
FIRST SAMPLE #	1	FIRST SAMPLE #	1
CYCLES	1	CYCLES	1
CYCLE TIME	0,15 min	CYCLE TIME	0,15 min
GRAPHICS PLOT	NO	GRAPHICS PLOT	NO
ORD. MAX	1,000 ABS	ORD. MAX	1,000 ABS
ORD. MIN	0,000 ABS	ORD. MIN	0,000 ABS
SCALE	20 mm/min	SCALE	20 mm/min
GRID	NO	GRID	NO
PRINT DATA	NO	PRINT DATA	NO
AUTO METHOD	NO	AUTO METHOD	NO
OPER. ID	-----	OPER. ID	-----
SAMPLE ID	-----	SAMPLE ID	-----

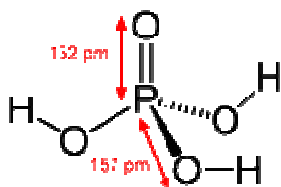
Tabla A.3.1. Valores de los parámetros del método predefinido 0003 (Lambda 14P) para los protocolos de valoración espectrofotométrica de las sondas fluorescentes.

A.4. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES TAMPÓN

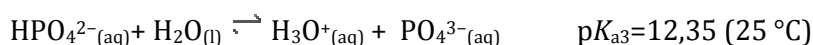
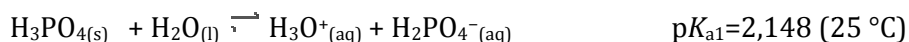
El objetivo de este apéndice es desarrollar ampliamente la información sobre las disoluciones tampón usadas en este trabajo, descritas anteriormente en el apartado 3.3.3. Con el uso de estos tampones se pretendía preparar muestras de referencia con un pH conocido y estable, de modo que sus resultados fueran contrastables con las disoluciones ácidas o básicas preparadas para otras muestras.

Dentro del rango fisiológico de pH se han empleado dos tipos de tampón, preparados en el laboratorio a partir de sus componentes: sales ácidas de fosfato para tampones de ion fosfato y disoluciones comerciales de imidazol. Para el rango extendido de pH (de 4 a 10), se han empleado tampones comerciales, cuyas propiedades se detallan en A.4.3.

A.4.1. Disoluciones tampón de ion fosfato



El ácido fosfórico (98,00 g/mol), cuya fórmula molecular es H₃PO₄, es un ácido poliprótico que presenta tres grados de disociación, correspondientes a cada una de las tres etapas en que puede ceder uno de sus protones. Los valores de pK_a asociados a cada equilibrio de disociación vienen dados por:



Combinando las cantidades adecuadas del ácido y sus sales pueden prepararse disoluciones tampón en un amplio rango de valores de pH, útiles en multitud de aplicaciones. Las ventajas de los tampones de fosfato son, entre otras:

- Los cambios del pH con la temperatura son relativamente pequeños.
- Una vez preparada, la solución es estable durante varias semanas (~4°C).
- Útil en multitud de aplicaciones fisiológicas.

Su principal desventaja es la tendencia a formar precipitados en presencia de iones Ca^{2+} y a precipitar sales de plomo.

En nuestro caso, el primer paso consiste en preparar disoluciones con concentraciones bien conocidas de las sales ácidas Na_2HPO_4 y NaH_2PO_4 . Conocidos los pesos moleculares de estos dos reactivos, se prepararon las disoluciones en matraces de 25ml, tal como se indica en la Tabla A.4.1.

	Cantidades de reactivos usadas para las disoluciones		Concentración de las disoluciones	
	Na_2HPO_4	NaH_2PO_4	$[\text{Na}_2\text{HPO}_4]$	$[\text{NaH}_2\text{PO}_4]$
$m_{0,1}$	0,3005 g	0,3567 g	$0,100 \pm 0,004 \text{ M}$	$0,101 \pm 0,004 \text{ M}$
$m_{0,4}$	1,2001 g	1,4194 g	$0,40 \pm 0,02 \text{ M}$	$0,40 \pm 0,02 \text{ M}$
m_1	2,9992 g	3,5490 g	$1,00 \pm 0,04 \text{ M}$	$1,00 \pm 0,04 \text{ M}$
$M_w(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 119,98 \text{ g/mol}; M_w(\text{NaH}_2\text{PO}_4) = 141,96 \text{ g/mol}$				

Tabla A.4.1. Disoluciones de sales de ion fosfato

A partir de estas dos disoluciones se pueden preparar tampones a diferentes valores de pH y con diferentes fuerzas iónicas. Utilizando la ecuación de Henderson-Hasselbach:

$$pH = pK_a + \log_{10} \frac{[\text{HPO}_4^{2-}]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]} \quad [\text{A4.1}]$$

En la Tabla A.4.2 se muestran los cálculos correspondientes a las muestras preparadas. Se indica el pH buscado (pH_{obj}), las cantidades usadas de cada disolución, el pH calculado a partir de la ecuación de Henderson-Hasselbach, los valores de pH y temperatura de las muestras una vez preparadas, así como las diferencias entre los valores calculados y los obtenidos experimentalmente.

Muestra	pH _{obj}	V _{HPO4}	V _{H2PO4}	pH _{calc}	pH	T (°C)	ΔpH
PB1	5,50	0,2 ml, 0,1M	10 ml, 0,1M	5,50	5,77	24,0	0,27
PB2	6,00	0,5 ml, 0,1M	8 ml, 0,1M	5,99	6,26	24,1	0,27
PB3	7,00	3 ml, 0,1M	5 ml, 0,1M	6,97	7,29	24,3	0,32
PB4	8,00	12 ml, 0,1M	2 ml, 0,1M	7,97	7,94	24,0	-0,03
PB41	5,50	0,2 ml, 0,4M	10 ml, 0,4M	5,50	5,28	25,0	-0,22
PB42	6,00	0,5 ml, 0,4M	8 ml, 0,4M	5,99	5,88	25,9	-0,11
PB44	7,50	10 ml, 0,4M	5 ml, 0,4M	7,50	7,59	26,2	0,09
PB101	8,00	10 ml, 1M	1,5 ml, 1M	8,02	7,53	22,3	0,49
PB102	7,00	3 ml, 1M	4 ml, 1M	7,07	6,87	22,3	0,20
PB103	6,00	0,25 ml, 1M	4 ml, 1M	5,99	5,61	22,4	0,38
PB104	5,00	0,1 ml, 1M	15 ml, 1M	5,02	4,96	22,4	0,06

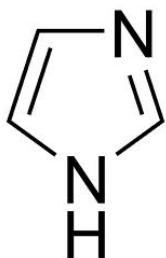
Tabla A.4.2. Cálculos y valores experimentales de las muestras tampón

Una vez preparadas las once muestras, se procedió a diluirlas en un factor 1:9 con una disolución de fluoresceína en agua (20μM), para obtener disoluciones de fluoresceína 2μM, a distintos valores de pH. Después, se volvieron a medir el pH (pH_{FL}) y la temperatura (T_{FL}) para comprobar que la regulación de pH no se ve afectada, tal como se muestra en la Tabla A.4.1c.

Muestra	pH _{obj}	pH	T (°C)	pH _{FL}	T _{FL} (°C)	ΔpH
PB1	5,50	5,77	24,0	5,69	25,1	-0,08
PB2	6,00	6,26	24,1	6,14	25,3	-0,12
PB3	7,00	7,29	24,3	7,08	24,6	-0,21
PB4	8,00	7,94	24,0	7,67	25,0	-0,27
PB41	5,50	5,28	25,0	5,29	25,0	0,01
PB42	6,00	5,88	25,9	5,89	25,9	0,01
PB44	7,50	7,59	26,2	7,58	25,3	-0,01
PB101	8,00	7,53	22,3	7,54	22,7	0,01
PB102	7,00	6,87	22,3	6,88	22,8	0,01
PB103	6,00	5,61	22,4	5,65	23,0	0,04
PB104	5,00	4,96	22,4	4,98	23,5	0,02

Tabla A.4.3. Valores de pH y temperatura de las muestras tamponadas

A.4.2. Disoluciones tampón de imidazol



El imidazol es un compuesto orgánico aromático heterocíclico. Está formado por un anillo plano pentagonal, y existen dos tautómeros, 1H-imidazol y 3H-imidazol. Es un compuesto altamente polar y totalmente soluble en agua. El imidazol es anfótero. Como ácido, el $pK_a=14,5$, por lo que es menos ácido que los ácidos carboxílicos, fenoles e imidas, pero un poco más ácido que los alcoholes. Como base, el pK_a del ácido conjugado es aproximadamente 7.

Siguiendo un procedimiento análogo al del apartado anterior, se prepararon varias disoluciones tampón a partir de una mezcla de imidazol comercial (1M) y ácido clorhídrico, también comercial (1M). Bajo estas líneas, en la Tabla A.4.2a se presentan los resultados. La columna pH_{calc} contiene los valores de pH calculados a partir de la ecuación de Henderson-Hasselbach para los volúmenes de imidazol y ácido clorhídrico que se indican. La última columna muestra la diferencia entre los valores calculados y los valores obtenidos experimentalmente.

Muestra	pH _{obj}	V _{Im-1M}	V _{HCl-1M}	V _{HCl-0,1M}	pH _{calc}	pH	T (°C)	ΔpH
IB101	6,00	1 ml	9 ml	--	6,04	6,32	25,0	0,28
IB102	7,00	5 ml	5 ml	--	6,99	7,06	24,5	0,07
IB103	8,00	9 ml	1 ml	--	7,95	8,13	24,5	0,18
IB104	9,00	9 ml	--	1 ml	8,95	9,00	24,0	0,05

Tabla A.4.4. Cálculos y valores experimentales de las muestras tampón

Una vez preparadas las muestras, se procedió a diluirlas en un factor 1:9 con una disolución de fluoresceína en agua (20μM), para obtener disoluciones de fluoresceína 2μM, a distintos valores de pH. Después, se volvieron a medir el pH (pH_{FL}) y la temperatura (T_{FL}) para comprobar que la regulación de pH no se ve afectada, tal como se muestra en la Tabla A.4.2b.

Muestra	pH _{obj}	pH	T (°C)	pH _{FL}	T _{FL} (°C)	ΔpH
IB101	6,00	6,32	25,0	6,38	25,9	0,06
IB102	7,00	7,06	24,5	7,08	26,0	0,02
IB103	8,00	8,13	24,5	8,04	25,8	-0,09
IB104	9,00	9,00	24,0	8,90	25,7	-0,10

Tabla A.4.5. Valores de pH y temperatura de las muestras tamponadas

A.4.3. Tampones comerciales (Panreac)

Además de los tampones de fosfato e imidazol anteriores, también se emplearon diversas disoluciones comerciales para la calibración del pH-metro, así como para otras medidas de referencia. A continuación se ofrece una tabla con algunas propiedades de las disoluciones comerciales empleadas (Panreac S.A.U.).

<p>Tampón, Solución pH 4,00 ±0,02 (20°C) ST Ref: 272168.1211 1l~1,008kg 1kg~0,992l</p> <p>Composición:</p> <p>Acido Cítrico 1 H₂O11,768 g Sodio Hidróxido 50% p/p6 ml Acido Clorhídrico 35%3,96 ml Conservante 1%.....5 ml Agua c.s.p.....1 l</p> <p>Variación del pH en función de la temperatura</p> <p>T(°C)..... ΔpH 0..... +0,05 5..... +0,04 10..... +0,02 15..... +0,01 20..... 0 25..... +0,01 30..... +0,01 35..... +0,01 40..... +0,01 50..... 0</p>	<p>Tampón, Solución pH 5,00 ±0,02 (20°C) ST Ref: 272582.1211 1l~1,015kg 1kg~0,985l</p> <p>Composición:</p> <p>Acido Cítrico 1 H₂O20,256 g Sodio Hidróxido 50% p/p10,45 ml Conservante 1%.....5 ml Agua c.s.p.....1 l</p> <p>Variación del pH en función de la temperatura</p> <p>T(°C)..... ΔpH 0..... +0,06 5..... +0,05 10..... +0,02 15..... +0,01 20..... 0 25..... 0 30..... 0 35..... 0 40..... 0 50..... +0,01</p>
<p>Tampón, Solución pH 7,00 ±0,02 (20°C) ST Ref: 272170.1211 1l~1,006kg 1kg~0,994l</p> <p>Composición:</p> <p>Potasio di-Hidrógeno Fosfato.....3,522 g di-Sodio HidrógenoFosfato·12H₂O ...14,020 g Conservante 1%5 ml Agua c.s.p1 l</p> <p>Variación del pH en función de la temperatura</p> <p>T(°C)..... ΔpH 0..... +0,13 5..... +0,07 10..... +0,05 15..... +0,02 20..... 0 25..... -0,02 30..... -0,02 35..... -0,04 40..... -0,05 50..... -0,05</p>	<p>Tampón, Solución pH 8,00 ±0,02 (20°C) ST Ref: 272583.1211 1l~1,002kg 1kg~0,998l</p> <p>Composición:</p> <p>Acido Bórico6,928 g Sodio Hidróxido 50% p/p3 ml Acido Clorhídrico 35%3,9 ml Conservante 1%5 ml Agua c.s.p.1 l</p> <p>Variación del pH en función de la temperatura</p> <p>T(°C)..... ΔpH 0..... +0,15 5..... +0,10 10..... +0,07 15..... +0,04 20..... 0 25..... -0,04 30..... -0,06 35..... -0,08 40..... -0,10 50..... -0,15</p>

Tampón, Solución pH 9,00 ±0,02 (20°C) ST Ref: 272172.1211	Tampón, Solución pH 10,00 ±0,05 (20°C) ST Ref: 272584.1211
1l~1,006kg 1kg~0,994l	1l~1,006kg 1kg~0,994l
Composición:	Composición:
Acido Bórico3,092 g	Acido Bórico3,092 g
Potasio Cloruro3,728 g	Potasio Cloruro3,728 g
Sodio Hidróxido 50% p/p1,10 ml	Sodio Hidróxido 50% p/p2,34 ml
Conservante 1%5 ml	Conservante 1%5 ml
Agua c.s.p.1 l	Agua c.s.p.1 l
Variación del pH en función de la temperatura	Variación del pH en función de la temperatura
T(°C)..... ΔpH	T(°C)..... ΔpH
0..... +0,24	0..... +0,26
5..... +0,16	5..... +0,17
10..... +0,11	10..... +0,11
15..... +0,05	15..... +0,05
20..... 0	20..... 0
25..... -0,05	25..... -0,06
30..... -0,09	30..... -0,11
35..... -0,12	35..... -0,16
40..... -0,15	40..... -0,18
50..... -0,21	50..... -0,26

Tabla A.4.6. Propiedades de los tampones comerciales (Panreac) seleccionados

A.5. ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS Y CÁLCULO DE ERRORES

En este apéndice vamos a presentar los métodos y expresiones que han sido utilizados en el trabajo para el cálculo de diversas magnitudes y la estimación de sus errores. En numerosos manuales de ingeniería y de estadística se pueden encontrar todas las hipótesis estadísticas y de cálculo, así como los desarrollos completos. Aquí nos limitaremos a presentar las expresiones más relevantes, de forma que sea comprensible el uso razonado de estos métodos.

A.5.1. Intervalos de confianza para la estimación de la media muestral

En medidas directas emplearemos la media muestral como estimación del valor real de la magnitud que hemos medido:

$$\hat{\mu} = \bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_i \quad [\text{A5.1}]$$

Para determinar un intervalo de confianza para esta estimación, recurrimos a la distribución *t-Student*. El desarrollo es el siguiente. Si suponemos que una población se distribuye normalmente con una media μ y una varianza σ^2 , sabemos que:

$$Z = \frac{\bar{X} - \mu}{\frac{\sigma}{\sqrt{n}}} \sim N(0,1) \quad [\text{A5.2}]$$

Sin embargo, la media y la varianza son, en general, desconocidas. Por otro lado, por el teorema de Cochran, podemos construir una variable independiente que sigue una distribución llamada Chi-cuadrado, con $n-1$ grados de libertad, siendo n el tamaño muestral:

$$\chi = \sum_{i=1}^n \frac{(X_i - \bar{X})^2}{\sigma^2} \sim \chi_{n-1}^2 \quad [\text{A5.3}]$$

A partir de estas relaciones podemos construir un nuevo estadístico, la *t* de Student. Su distribución es, en el límite una distribución normal, pero que permite obtener buenas estimaciones de la media de una población (ya que habitualmente la desviación σ no es conocida de antemano), especialmente cuando el tamaño muestral es pequeño. Si definimos:

$$T_{n-1} = \frac{Z}{\sqrt{\frac{1}{n-1} \chi^2_{n-1}}} = \frac{\frac{\bar{X} - \mu}{\frac{\sigma}{\sqrt{n}}}}{\sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n \frac{(X_i - \bar{X})^2}{\sigma^2}}} \quad [\text{A5.4}]$$

Denominamos S^2 a la varianza muestral, un estimador no sesgado de la varianza σ^2 , que sigue una distribución χ^2 :

$$S^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2 \quad [\text{A5.5}]$$

Simplificando la expresión anterior tenemos que *T* sigue una distribución *t-Student* con $n-1$ grados de libertad para un nivel de significación $1-\alpha$:

$$T_{n-1} = \frac{\bar{X} - \mu}{S/\sqrt{n}} \sim t_{n-1, 1-\alpha} \quad [\text{A5.6}]$$

Construiremos nuestro intervalo de confianza para la media, μ , a partir de la media muestral, la varianza muestral y el tamaño muestral haciendo uso de los percentiles de la distribución *t-Student*. Recurriendo a las propiedades de simetría de la distribución, nuestro intervalo será:

$$\hat{\mu} = \bar{X} \pm t_{n-1, 1-\alpha} \cdot \frac{S}{\sqrt{n}} \quad [\text{A5.7}]$$

Esta es la fórmula empleada en los cálculos de los intervalos de confianza para la media de una población, a partir de los estadísticos muestrales y de los percentiles de la distribución, cuyos valores se dan en la tabla adjunta al final de este apéndice. A menos que se especifique otra cosa, siempre se ha calculado el intervalo de confianza para un nivel de significación del 95% ($\alpha=0,05$). De modo que los percentiles usados corresponden a $t_{n-1, 0,975}$.

A.5.2. Propagación de errores en las medidas indirectas

Del mismo modo que podemos calcular un intervalo de confianza para las medidas directas a través del análisis estadístico, también es posible estimar un intervalo para las medidas indirectas, cuyas magnitudes se derivan de otras que sí hemos determinado de forma experimental.

La expresión que relaciona las magnitudes medidas nos proporciona una estimación del valor de la variable que queremos conocer. Ahora bien, estas medidas indirectas llevan asociadas la propagación del error debido a cada una de las variables relacionadas. En este apartado tenemos que distinguir dos casos:

La propagación de errores relacionados exclusivamente con la precisión de la medida. En este caso el error se obtiene a partir de una aproximación lineal.

La propagación de errores a partir de estimaciones estadísticas o de magnitudes derivadas cuyo error se haya calculado como en el caso anterior. Si bien ahora el cálculo también parte de una aproximación lineal, el significado de los términos es bien distinto.

Para el primer caso, consideremos el método de la aproximación lineal del error. Se basa en la definición de diferencial total (a partir de una linealización de primer orden):

Sea Z una magnitud derivada a partir de un número n de magnitudes x_i , cada una con una incertidumbre Δx_i . Si la relación entre todas las variables viene dada por:

$$Z = f(x_1, x_2, \dots, x_n)$$

Entonces definimos el diferencial total de la función Z como:

$$dZ = \frac{\partial f}{\partial x_1} dx_1 + \frac{\partial f}{\partial x_2} dx_2 + \cdots + \frac{\partial f}{\partial x_n} dx_n = \sum_{i=1}^n \frac{\partial f}{\partial x_i} dx_i \quad [\text{A5.8}]$$

Aproximando los diferenciales a sus diferencias finitas (aquí tiene lugar la aproximación de primer orden), podemos escribir la ecuación anterior del siguiente modo:

$$\Delta Z = \frac{\partial f}{\partial x_1} \Delta x_1 + \frac{\partial f}{\partial x_2} \Delta x_2 + \cdots + \frac{\partial f}{\partial x_n} \Delta x_n = \sum_{i=1}^n \frac{\partial f}{\partial x_i} \Delta x_i \quad [\text{A5.9}]$$

Si consideramos que estas diferencias finitas (Δx_i) son una estimación del error asociado a cada una de sus magnitudes correspondientes (x_i), la expresión anterior permite calcular la incertidumbre de una magnitud derivada Z, conociendo las incertidumbres de las magnitudes de las que deriva y su relación funcional. De modo que podremos definir una estimación de Z construyendo un intervalo de confianza de la forma:

$$\hat{Z} = Z_{\text{calculado}} \pm \Delta Z$$

Como las relaciones funcionales de algunas magnitudes pueden hacer que los valores de $\partial f / \partial x_i < 0$ (sean negativos), esta forma de estimar ΔZ puede dar lugar a que las contribuciones de dos o más variables se cancelen total o parcialmente entre sí, ofreciendo un intervalo de confianza más estrecho. Si se quiere utilizar un método más conservador o “pesimista”, puede tomarse el valor absoluto de cada término, haciendo así que *la incertidumbre total sea la suma positiva de la contribución de las incertidumbres parciales*:

$$\Delta Z = \left| \frac{\partial f}{\partial x_1} \right| \Delta x_1 + \left| \frac{\partial f}{\partial x_2} \right| \Delta x_2 + \cdots + \left| \frac{\partial f}{\partial x_n} \right| \Delta x_n = \sum_{i=1}^n \left| \frac{\partial f}{\partial x_i} \right| \Delta x_i \quad [\text{A5.10}]$$

Para el segundo caso, es decir, cuando los errores de las variables que manejamos son las varianzas estadísticas (o junto con éstas hay magnitudes derivadas tratadas según el caso anterior), la aproximación lineal del error consiste en relacionar las varianzas; donde el sumatorio de términos σ_{ij}^2 se extiende a todos los términos de la matriz de covarianzas. Si todas las variables son independientes entre sí, entonces se anularán todas las covarianzas ($\sigma_{ij}^2 = 0, i \neq j$), pudiendo simplificar la expresión anterior:

$$\sigma^2 = \left(\frac{\partial f}{\partial x_1}\right)^2 \sigma_1^2 + \left(\frac{\partial f}{\partial x_2}\right)^2 \sigma_2^2 + \dots + \left(\frac{\partial f}{\partial x_n}\right)^2 \sigma_n^2 = \sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial f}{\partial x_i}\right)^2 \sigma_i^2 \quad [\text{A5.11}]$$

Si relacionamos el error con la varianza ($\Delta x_i = \sigma_i$), finalmente obtenemos:

$$(\Delta Z)^2 = \left(\frac{\partial f}{\partial x_1}\right)^2 (\Delta x_1)^2 + \left(\frac{\partial f}{\partial x_2}\right)^2 (\Delta x_2)^2 + \dots + \left(\frac{\partial f}{\partial x_n}\right)^2 (\Delta x_n)^2 = \sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial f}{\partial x_i}\right)^2 (\Delta x_i)^2 \quad [\text{A5.12}]$$

Alternativamente, tomando raíces cuadradas:

$$\Delta Z = \sqrt{\left(\frac{\partial f}{\partial x_1}\right)^2 (\Delta x_1)^2 + \left(\frac{\partial f}{\partial x_2}\right)^2 (\Delta x_2)^2 + \dots + \left(\frac{\partial f}{\partial x_n}\right)^2 (\Delta x_n)^2} = \sqrt{\sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial f}{\partial x_i}\right)^2 (\Delta x_i)^2} \quad [\text{A5.13}]$$

A veces podemos encontrar expresiones análogas a ésta. Por ejemplo, en algunos textos, especialmente en el análisis de señales [92-97], es frecuente estimar el error de una señal tomando en cuenta cada una de las fuentes de error (ϵ_{total}):

$$\epsilon_{total} = \sqrt{\sum_i \epsilon_i^2} \quad [\text{A5.14}]$$

A.5.3. Estimación e intervalos de confianza de parámetros de regresión lineal

Sea un conjunto de pares ordenados de datos (x_i, y_i) perteneciente a un conjunto de N medidas. Si ajustamos estos valores a la recta $Y = mX + n$, donde m es la pendiente de la recta y n es la ordenada en el origen, entonces, para cada valor de x_i existe una estimación $Y_i = mx_i + n$.

Los parámetros m , n que dan lugar al mejor al ajuste (y que además cumplen las hipótesis del modelo de regresión) son aquellos que minimizan la suma de los cuadrados de los errores entre el modelo y el dato real: $Y_i - y_i$. Sus valores se calculan como:

$$m = \frac{\sum_{i=1}^N x_i y_i - \frac{1}{n} \sum_{i=1}^N x_i \sum_{i=1}^N y_i}{\sum_{i=1}^N x_i^2 - \frac{1}{n} \left(\sum_{i=1}^N x_i \right)^2} \quad [\text{A5.15}]$$

$$n = \bar{y} - m\bar{x} \quad [\text{A5.16}]$$

Por otra parte, los intervalos de confianza para estas estimaciones son:

$$\hat{m} = m \pm t_{n-2, 1-\alpha} \cdot S_m \quad [\text{A5.17}]$$

$$\hat{n} = n \pm t_{n-2, 1-\alpha} \cdot S_n \quad [\text{A5.18}]$$

Donde:

$$S_m = \sqrt{\frac{\frac{1}{N-2} \sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad [\text{A5.19}]$$

$$S_n = S_m \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i^2} = \sqrt{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2 \frac{\frac{1}{N(N-2)} \sum_{i=1}^N x_i^2}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad [\text{A5.20}]$$

Por otra parte, para determinar la bondad del ajuste, podemos calcular el coeficiente de correlación o coeficiente de Pearson, que determina la parte de la variabilidad explicada por el modelo; de modo que $|\rho^2| = 1$ significa que el modelo es capaz de explicar toda la variabilidad. Su expresión matemática es:

$$\rho^2 = \frac{S_{xy}}{S_x^2 S_y^2} \quad [\text{A5.21}]$$

En segundo lugar, hay que realizar un contraste de hipótesis para comprobar que las estimaciones paramétricas del modelo tienen sentido. En un modelo de regresión, la

hipótesis nula consiste en que el parámetro estimado es cero ($m=0$, $n=0$). La hipótesis alternativa consiste en afirmar que el parámetro no es nulo ($m \neq 0$, $n \neq 0$).

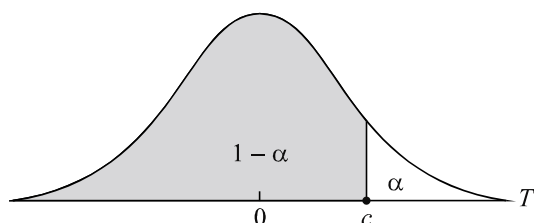
Parámetro	Pendiente (m)	Ordenada en el origen (n)
Hipótesis nula	$H_0: m=0$	$H_0: n=0$
Hipótesis alternativa	$H_1: m \neq 0$	$H_1: n \neq 0$
Estadístico de contraste	$t_m = \frac{m}{S_m}$	$t_n = \frac{n}{S_n}$

Para aceptar o rechazar la hipótesis nula, se utiliza el **p-valor**, que es el nivel de significación mínimo (α) a partir del cual se puede rechazar la hipótesis nula. Una forma de comprobar el resultado es comparar el estadístico de contraste (t_m, t_n) con el valor t de la tabla de la distribución **t-Student**, donde N es el tamaño muestral de la regresión y α es el nivel de significación. Si el estadístico de contraste es mayor que el valor de la tabla, podemos rechazar la hipótesis nula.

Así, por ejemplo, al calcular la recta de regresión para $N=10$ puntos, hemos obtenido un valor para la pendiente de $m=1,005$ ($S_m=0,0012$) y un valor de $n=0,0029$ ($S_n=0,0014$). Los estadísticos de contraste serán: $t_m=837,5$; $t_n=2,071$. Para un nivel de confianza del 95%, el valor t de la tabla será **$t(8, 0,975)=2,306$** . Podemos rechazar la hipótesis nula para la pendiente pero podemos aceptar la hipótesis nula para la ordenada en el origen. Así, nuestro modelo de regresión será: **$y=(1,0050 \pm 0,0012)x$** , para un nivel de confianza del 95%.

A.5.4. Tabla de la distribución *t*-Student

La tabla da áreas $1-\alpha$ y valores $c = t_{n, 1-\alpha}$, donde, $P(T \leq c) = 1-\alpha$, y donde T tiene distribución *t*-Student con n grados de libertad. Para el cálculo de intervalos de confianza a ambos lados, se busca el valor $c = t_{n, 1-\alpha/2}$, donde $P(|T| \leq c) = 1-\alpha/2$



$n \backslash 1-\alpha$	0,75	0,80	0,85	0,90	0,95	0,975	0,99	0,995
1	1,000	1,376	1,963	3,078	6,314	12,706	31,821	63,657
2	0,816	1,061	1,386	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925
3	0,765	0,978	1,250	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841
4	0,741	0,941	1,190	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604
5	0,727	0,920	1,156	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032
6	0,718	0,906	1,134	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707
7	0,711	0,896	1,119	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499
8	0,706	0,889	1,108	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355
9	0,703	0,883	1,100	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250
10	0,700	0,879	1,093	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169
11	0,697	0,876	1,088	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106
12	0,695	0,873	1,083	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055
13	0,694	0,870	1,079	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012
14	0,692	0,868	1,076	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977
15	0,691	0,866	1,074	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947
16	0,690	0,865	1,071	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921
17	0,689	0,863	1,069	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898
18	0,688	0,862	1,067	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878
19	0,688	0,861	1,066	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861
20	0,687	0,860	1,064	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845
21	0,686	0,859	1,063	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831
22	0,686	0,858	1,061	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819
23	0,685	0,858	1,060	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807
24	0,685	0,857	1,059	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797
25	0,684	0,856	1,058	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787
26	0,684	0,856	1,058	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779
27	0,684	0,855	1,057	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771
28	0,683	0,855	1,056	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763
29	0,683	0,854	1,055	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756
30	0,683	0,854	1,055	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750
40	0,681	0,851	1,050	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704
60	0,679	0,848	1,046	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660
120	0,677	0,845	1,041	1,289	1,658	1,980	2,358	2,617
∞	0,674	0,842	1,036	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576

A.6. ANÁLISIS DE DATOS EN MEDIDAS TCSPC

Partiendo del modelo TCSPC que permite obtener la respuesta temporal de un sistema ante un pulso de excitación, vamos a exponer el método de análisis que permite obtener los tiempos de vida de un fluoróforo a partir de estas respuestas temporales.

Llamamos pulso de excitación o *decaimiento de la lámpara*, $E(t)$, a la respuesta temporal de la fuente de excitación pulsada. Este decaimiento no contiene información exclusiva del paquete de fotones generados en cada pulso, sino que, a su vez, es la convolución del pulso original con la contribución de todas las etapas del sistema.

Llamamos *intensidad del decaimiento*, $I(t)$, a la respuesta temporal de la emisión de una molécula fluorescente. Esta intensidad es una función que depende de las propiedades del fluoróforo y cuyo modelo matemático nos permite conocer el comportamiento de los fluoróforos en el estado excitado. En la mayoría de los casos, podemos escribir este modelo como:

$$I(t) = \sum_{i=1}^n A_i \cdot \exp(-t/\tau_i) \quad [\text{A6.1}]$$

Normalmente, los coeficientes A_i indican un factor de amplitud por el que multiplicar cada exponencial para ajustar al número total de cuentas del histograma del decaimiento. Si se desea expresar esta amplitud en función de los factores preexponenciales, basta con normalizar los coeficientes, de modo que.

$$\alpha_i = \frac{A_i}{\sum A_k} \quad [\text{A6.2}]$$

Finalmente, llamamos *decaimiento*, $D(t)$, a la respuesta temporal que podemos medir de un fluoróforo ante una fuente de excitación. Este decaimiento es, por tanto, la convolución del decaimiento de la lámpara y de la intensidad del decaimiento: $D(t) = E(t) \otimes I(t)$.

A.6.1. Método de deconvolución de tiempos de vida por mínimos cuadrados no lineales

Dado que la intensidad no es medible directamente, el problema de recuperar los tiempos de vida a partir de la intensidad implica resolver un problema inverso: la deconvolución de las señales que podemos medir en un fluorímetro. Sin embargo, matemáticamente es un *problema mal planteado* que no tiene una verdadera solución analítica. Esta cuestión ha sido desarrollada ampliamente en la literatura y se han propuesto diferentes métodos de resolución [61,92]. En este trabajo nos limitamos a presentar las características fundamentales del método de reconvolución por mínimos cuadrados no lineales.

Este método se basa en las siguientes hipótesis:

- Los histogramas representan mediante valores discretos la suma de eventos discretos individuales.
- Todas las observaciones son independientes entre sí.
- Toda la incertidumbre experimental se encuentra en la variable dependiente y sigue una distribución gaussiana.
- No hay errores sistemáticos en ninguna de las dos variables.
- Hay un número suficiente de datos como para que la búsqueda de parámetros sea un sistema sobredeterminado (de ecuaciones).
- La función analítica que empleamos en el ajuste es la expresión matemática que describe el comportamiento particular de nuestro sistema.

El método de mínimos cuadrados no lineales utiliza un algoritmo iterativo para buscar el mínimo de la función objetivo definida a partir de los residuos ponderados:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^N w_i r_i^2 = \sum_{i=1}^N w_i [D_{EXP}(t_i) - \widehat{D}(t_i)]^2 \quad [A6.3]$$

Los residuos son la diferencia entre el decaimiento de la muestra y la convolución del decaimiento de la lámpara con un modelo matemático teórico $I_{TEOR}(t)$:

$$\widehat{D}(t) = E_{EXP}(t) \otimes I_{TEOR}(t)$$

Una forma de ponderar los residuos es a través de la inversa de la varianza de cada valor ($w_i = 1/\sigma_i^2$), de manera que la contribución sea mayor para datos “menos ruidosos” y menor para aquellos que son “más ruidosos”. Como cada cuenta es un evento individual que sigue una ley exponencial, la distribución de cuentas a lo largo de los canales del histograma seguirá una distribución de Poisson. En este caso, la desviación típica para una distribución de Poisson (ruido de Poisson) es igual a la raíz cuadrada del número de cuentas. Por tanto:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^N w_i r_i^2 = \sum_{i=1}^N \frac{r_i^2}{\sigma_i^2} = \sum_{i=1}^N \frac{[D_{EXP}(t_i) - \widehat{D}(t_i)]^2}{D_{EXP}(t_i)} \quad [A6.4]$$

A.6.2. Modelos exponenciales de decaimiento

En cuanto a la elección del modelo teórico de ajuste, existen, en la práctica, una gran cantidad de alternativas. Buena parte de ellas están incluidas en los programas de software comercial o son fáciles de implementar pero todas están basadas en modelos exponenciales, ya que la emisión espontánea es un proceso que sigue un decaimiento exponencial. El modelo más sencillo consiste en suponer que la muestra sigue un decaimiento monoexponencial: $I(t) = \exp(-t/\tau)$, donde τ es el tiempo de vida de fluorescencia. Este modelo es el más empleado para sondas en disolución o sistemas simples, donde el parámetro τ es una buena estimación del promedio de tiempos de vida de los procesos individuales de absorción y emisión que tienen lugar en un volumen donde el número de eventos por cada ciclo de excitación es muy elevado y donde las propiedades del sistema (isotropía, homogeneidad) hacen válida la aceptación del promedio estadístico como estimador principal.

En sistemas más complejos podemos suponer que el modelo es la suma de varias exponenciales:

$$I(t) = \sum_{i=1}^n A_i \cdot \exp(-t/\tau_i) \quad [A6.1]$$

En un sistema con un único fluoróforo, el significado de los **factores preexponenciales** (α_i) es el de la fracción de moléculas del fluoróforo en una conformación con un tiempo de vida τ_i . La **intensidad relativa** f_i representa la

contribución normalizada de cada tiempo de vida a la intensidad total del espectro estacionario. Matemáticamente se expresa como:

$$f_i = \frac{\alpha_i \cdot \tau_i}{\sum_{j=1}^n \alpha_j \cdot \tau_j} \quad [\text{A6.5}]$$

En sistemas multiexponenciales podemos definir el tiempo de vida promedio:

$$\langle \tau \rangle = \frac{\int_0^\infty t I(t) dt}{\int_0^\infty I(t) dt} = \frac{\int_0^\infty t \sum \alpha_i \cdot e^{(-t/\tau_i)} dt}{\int_0^\infty \sum \alpha_i \cdot e^{(-t/\tau_i)} dt} \quad [\text{A6.6}]$$

Utilizando las propiedades del sumatorio y de la integral:

$$\langle \tau \rangle = \frac{\sum \alpha_i \tau_i^2}{\sum \alpha_i \tau_i} = \sum f_i \tau_i \quad [\text{A6.7}]$$

Aunque en ocasiones podemos encontrar definido el promedio en función de la amplitud por medio de los factores preexponenciales como: $\langle \tau \rangle_A = \sum \alpha_i \cdot \tau_i$. En lo sucesivo, para distinguir ambas cantidad, se utilizará un subíndice (I) para el promedio temporal y un subíndice (A) para el promedio de amplitudes.

A.6.3. Algoritmo numérico para resolver el problema de mínimos cuadrados no lineales

Para minimizar la función objetivo suele emplearse el algoritmo de Levenberg-Marquardt [80,96], que combina el método de Gauss-Newton (rápida convergencia) con un método de gradiente descendiente (mejora la búsqueda de soluciones iniciales). En su forma matricial, el sistema de ecuaciones que resuelve el problema de mínimos cuadrados es el siguiente:

$$[\mathcal{J}^T \mathcal{J} + \lambda \cdot \text{diag}(\mathcal{J}^T \mathcal{J})] \delta = \mathcal{J}^T \chi^2(\beta) \quad [\text{A6.8}]$$

Donde \mathbf{J} es la matriz jacobiana de la función objetivo $\chi^2(\boldsymbol{\beta})$; $\boldsymbol{\beta}$ es el vector que contiene los parámetros de nuestro modelo (tiempos de vida, factores preexponenciales, desfases temporales,...); $\boldsymbol{\delta}$ es un vector de incrementos compatible con $\boldsymbol{\beta}$. Finalmente, λ es un parámetro variable en cada iteración. Resolviendo el sistema de ecuaciones para $\boldsymbol{\delta}$:

$$\boldsymbol{\delta} = [\mathbf{J}^T \mathbf{J} + \lambda \cdot \text{diag}(\mathbf{J}^T \mathbf{J})]^{-1} \mathbf{J}^T \chi^2(\boldsymbol{\beta}) \quad [\text{A6.9}]$$

Cuando el valor de la función objetivo disminuye significativamente en una iteración, se reduce el parámetro λ , de modo que el método se parece más a un método de Gauss-Newton, ofreciendo una rápida convergencia. Si por el contrario, una iteración no reduce significativamente el valor de la función objetivo, entonces se aumenta el valor de λ hasta encontrar una combinación de valores que haga que el método converja más rápidamente a una solución. Por otra parte, la introducción de la matriz diagonal introduce un factor de escala que aumenta la convergencia en los parámetros cuyo gradiente es menor.

Una implementación básica del algoritmo de Levenberg-Marquardt puede resumirse haciendo uso del siguiente esquema iterativo:

- | | | |
|-----|--|---|
| [1] | Asignar $\boldsymbol{\beta} \leftarrow \boldsymbol{\beta}_0$ | [Inicializar parámetros] |
| [2] | Evaluar $\chi^2(\boldsymbol{\beta})$ | [Evaluar función objetivo] |
| [3] | Asignar $\lambda \leftarrow \lambda_0=0,001$ | [Inicializar parámetro λ] |
| [4] | Resolver $\boldsymbol{\delta}$ | [Resolver el sistema de ecuaciones para $\boldsymbol{\delta}$] |
| [5] | Evaluar $\chi^2(\boldsymbol{\beta}_0 + \boldsymbol{\delta})$ | [Evaluar función objetivo] |
| [6] | Si $(\chi^2(\boldsymbol{\beta} + \boldsymbol{\delta}) \geq \chi^2(\boldsymbol{\beta})) \wedge (\epsilon \equiv 0)$ | |
| | $\lambda \leftarrow 10 \cdot \lambda$ | |
| | Volver a [4] | |
| | Si $(\chi^2(\boldsymbol{\beta} + \boldsymbol{\delta}) \leq \chi^2(\boldsymbol{\beta})) \wedge (\epsilon \equiv 0)$ | |
| | $\lambda \leftarrow \lambda/10$ | |
| | Volver a [4] | |

En este esquema, ϵ es un parámetro de control que sirve como límite de convergencia para el valor de la función objetivo y que debe tener en cuenta las reducciones o aumentos significativos de la función objetivo tras varias iteraciones. Por otra parte, a partir de la matriz hessiana ($\mathbf{J}^T \mathbf{J}$) podemos obtener las covarianzas y por tanto, los errores asintóticos de los parámetros estimados.

A.6.4. Simplificaciones en el método computacional

La principal dificultad que aparece desde el punto de vista computacional es que en cada iteración debemos evaluar los valores de $\widehat{D}(t_i)$, que se calculan a partir de la convolución del perfil experimental de la lámpara con una discretización de la ecuación modelo. Grinvald y Steinberg ^[61] propusieron en 1974 un método de convolución rápida iterativa.

Consideremos el caso general de la convolución de un perfil arbitrario de excitación $E(x)$ con una suma de exponenciales.

$$\widehat{D}(t) = \int_0^t E(x) \sum_i K_i \cdot \exp\left[-\frac{t-x}{\tau_i}\right] dx \quad [\text{A6.10}]$$

Aplicando las propiedades de la integral:

$$\widehat{D}(t) = \sum_i K_i \cdot \exp(-t/\tau_i) \cdot \int_0^t E(x) \exp(x/\tau_i) dx \quad [\text{A6.11}]$$

Si discretizamos las funciones dentro del intervalo de tiempos, tenemos que:

$$\widehat{D}_{j+1} = \sum_i K_i \cdot \exp(-t_{j+1}/\tau_i) \cdot \left(\underbrace{\int_0^{t_j} E(x) \exp(x/\tau_i) dx}_{I_{ij}} + \underbrace{\int_{t_j}^{t_{j+1}} E(x) \exp(x/\tau_i) dx}_{\Delta I_{ij}} \right) \quad [\text{A6.12}]$$

O de forma abreviada:

$$\widehat{D}_{j+1} = \sum_i K_i \cdot \exp(-t_{j+1}/\tau_i) \cdot (I_{ij} + \Delta I_{ij}) \quad [\text{A6.13}]$$

El método de Grinvald-Steinberg supone que los términos integrales pueden aproximarse mediante la regla del trapecio. Si la escala de tiempos está distribuida en intervalos regulares (lo que sucede en los histogramas de acumulación de cuentas), la expresión para ΔI_{ij} será:

$$\Delta I_{ij} = \left(\frac{\Delta t}{2}\right) \cdot [E_{j+1} \exp(t_{j+1}/\tau_i) + E_j \exp(t_j/\tau_i)] \quad [\text{A6.14}]$$

Por otra parte, definimos:

$$\vartheta_i = \exp(-\Delta t/\tau_i), \quad \alpha_i = K_i(\Delta t/2) \quad [\text{A6.15}]$$

Entonces:

$$\widehat{D}_{j+1} = \sum_i \left[\underbrace{K_i \cdot \exp(-t_j/\tau_i) I_{ij}}_{\widehat{D}_j} \vartheta_i + \alpha_i (E_{j+1} + E_j \vartheta_i) \right] = \sum_i [(\widehat{D}_j + \alpha_i E_j) \vartheta_i + \alpha_i E_{j+1}] \quad [\text{A6.16}]$$

Por tanto, en cada iteración hay que realizar una evaluación de los vectores de coeficientes ϑ_i y α_i a partir de los parámetros estimados (τ_i, K_i) y después sólo son necesarias operaciones aritméticas simples para obtener una por una las componentes del vector \widehat{D}_j , aplicando esta fórmula iterativa.

A.6.5. Idoneidad del modelo. Test de bondad del ajuste

La solución que obtenemos aplicando el método de mínimos cuadrados no lineales (o cualquier otro método) minimiza una función objetivo asignando unos parámetros óptimos a nuestro modelo. Sin embargo, la solución encontrada no garantiza que hayamos encontrado el modelo que mejor representa nuestros datos (y menos aún que represente la realidad física del sistema). Por consiguiente, debemos efectuar algunas comprobaciones sobre las hipótesis del modelo. Las pruebas de bondad del ajuste más comúnmente empleadas son sobre la distribución de los residuos.

Como podemos comprobar, la función objetivo debería seguir una *distribución chi-cuadrado*. Además, como el número de datos (N) es muy elevado frente al número de parámetros (p), podemos suponer que se cumple la relación asintótica:

$$\chi^2 \sim \frac{S^2}{\sigma^2} \quad [\text{A6.17}]$$

Como la varianza muestral $S_R^2 = S^2/(N - p)$ es un estimador no sesgado de la varianza ($S_R^2 \sim \sigma^2$), se cumplirá que:

$$\chi_R^2 = \frac{\chi^2}{N - p} \sim 1 \quad [\text{A6.18}]$$

Elegimos, por tanto, el parámetro χ_R^2 (**chi-cuadrado reducido**) como estadístico para establecer un test de bondad del ajuste.

$$\text{Test de bondad del ajuste} \begin{cases} \chi_R^2 < 1, & \text{Modelo sobreestima la variabilidad con el ruido} \\ \chi_R^2 \cong 1, & \text{Buen ajuste} \\ \chi_R^2 > 1, & \text{Modelo no explica toda la variabilidad} \end{cases}$$

En cualquier caso, este test estadístico nos informa acerca de la distribución de los residuos pero no nos da ninguna información acerca de su independencia. Al principio hemos supuesto que la función analítica escogida para el modelo ha de ser la correcta pero en realidad desconocemos *a priori* cuál es la solución. Si hay algún error sistemático que haya pasado desapercibido o el modelo es incorrecto, el ajuste puede ser bueno pero existirá una correlación entre los datos. Por ese motivo, el análisis complementario a cualquier ajuste debe ser la función de autocorrelación.

Sea R_i el residuo ponderado ($R_i = \sqrt{w_i} r_i$) en un modelo con p parámetros para un histograma con N canales. Definimos la **función de autocorrelación** como la correlación de los residuos separados por una distancia variable de j canales.

$$C(t_j) = \left(\frac{1}{m} \sum_{i=1}^m R_i R_{i+j} \right) / \left(\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N R_i^2 \right) \quad [\text{A6.19}]$$

Si la función de autocorrelación no presenta ningún tipo de estructura (correlación) entre los residuos, podremos asegurar que el modelo propuesto a priori ajusta satisfactoriamente nuestras observaciones y es, por tanto, una descripción correcta del sistema.

En ocasiones, la elección del modelo no es trivial, especialmente cuando se trata de sistemas complejos cuya variabilidad puede quedar explicada por varios modelos. En la práctica, salvo que haya un conocimiento previo del comportamiento del sistema o que la elección del modelo se base en la interpretación de un modelo físico, se suele recurrir al principio de Ockham: *la solución completa más sencilla es la más probable, aunque no es necesariamente la verdadera*.

Finalmente, diremos que resulta difícil establecer con precisión la incertidumbre de los parámetros estimados, ya que el modelo no tiene en cuenta la correlación de los parámetros. J. R. Lakowicz afirma ^[6-7] que los errores asintóticos que ofrecen los módulos de software comercial suelen ser subestimaciones de los errores reales. Propone, en su lugar, un análisis de plano de fases para el conjunto de soluciones χ_R^2 , realizando un test estadístico con la *distribución F* (Fisher-Snedecor).

A.7. MÉTODOS NUMÉRICOS PARA EL ACONDICIONAMIENTO DE SEÑALES

Si bien la mayoría de los datos obtenidos para este trabajo han sido empleados directamente, sin modificaciones ni transformaciones, ha sido necesario recurrir a métodos numéricos para acondicionar la forma de algunos espectros. El ruido experimental a bajas concentraciones, las desviaciones habituales en una medición continua no repetida o la existencia de una línea de base han sido las razones para “transformar” los datos originales.

En general, en la medida de diferentes señales o espectros obtenemos una serie de valores en los que la señal que deseamos medir y el ruido que produce el sistema aparecen combinados. Sin embargo, gracias a los métodos numéricos podemos transformar los datos originales de manera que obtengamos un nuevo conjunto de valores que suponemos describe nuestro sistema con mayor precisión. A continuación presentamos los métodos numéricos empleados, indicando claramente el algoritmo utilizado en cada caso.

A.7.1. Corrección de la línea de base por mínimos cuadrados

Los espectros de absorción se obtienen comparando la absorbancia de una muestra con una referencia o blanco. Sin embargo, es frecuente encontrar una serie larga de espectros en las que sus líneas base no estén exactamente en el “0”, o que incluso haya diferentes líneas de base.

A la hora de corregir este efecto, nuestra *hipótesis* consiste en afirmar que *en todo espectro de absorción hay una perturbación lineal que llamamos línea de base y que podemos eliminar de nuestras medidas por sustracción de un binomio de primer orden mediante la siguiente transformación:*

$$y_{CORR} = y_{EXP} - mx_{EXP} - n \quad [A7.1]$$

Para efectuar esta transformación es preciso que los espectros contengan una parte de información en la que la sonda fluorescente no tenga absorción. Esto suele

conseguirse ampliando el límite superior de longitudes de onda, ya que hay ciertas energías más bajas que no son capaces de excitar a la sonda. Se selecciona esta región del espectro y se ajustan sus valores a una recta por un ajuste de mínimos cuadrados ($y = mx + n$). En el ejemplo de la figura adjunta, se representa el espectro de absorción de una muestra de amarillo de acridina ($C=3,8\mu\text{M}$; $\epsilon_{\text{MAX}}=39400\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Las curvas (a) y (b) pertenecen a medidas de absorbancia que tienen una línea de base lineal y constante, respectivamente. La curva (c) pertenece al espectro de absorción corregido. La línea discontinua representa la contribución lineal que podemos separar ajustando por mínimos cuadrados la región 500nm-600nm del espectro.

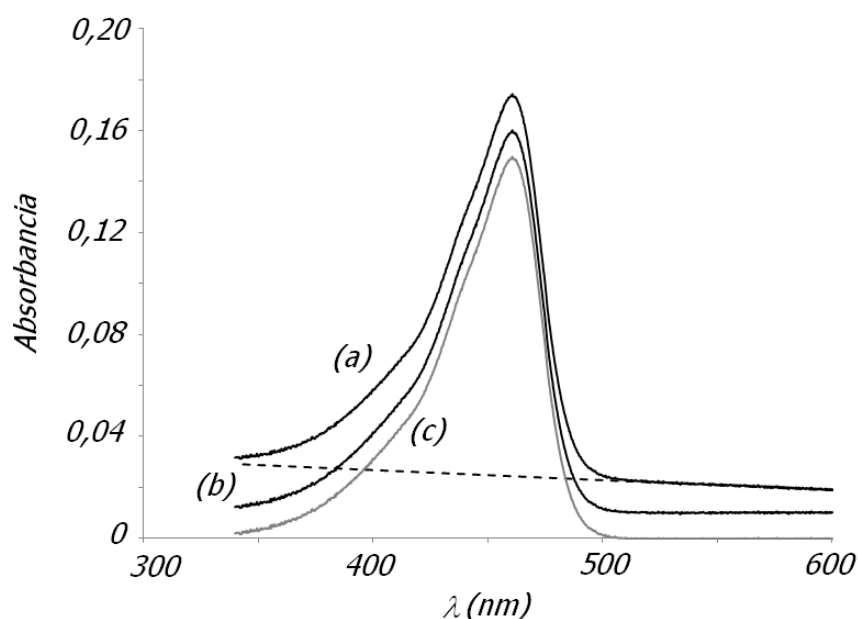


Figura A7.1. Corrección de línea de base de espectros. La curva (a) requiere una corrección lineal (línea punteada), mientras que la curva (b) sólo precisa un desplazamiento vertical (independiente de la longitud de onda). La curva (c) es el espectro corregido.

A.7.2. Acondicionamiento de señales mediante filtros de Savitzky-Golay

Cuando la perturbación que suponemos que interviene en nuestras medidas no es una línea de base sino un ruido adicional de las medidas individuales, podemos aplicar diversas técnicas de filtrado y suavizado de señales. La solución de compromiso debe reducir el ruido sin perturbar la amplitud y la forma de la señal. Esto puede resultar útil cuando queremos calcular el máximo de un espectro ruidoso o el punto de inflexión de una curva experimental.

Una forma de implementar esta solución consiste en ajustar por intervalos nuestros datos a un polinomio, mediante mínimos cuadrados, manteniendo los momentos superiores de la serie de datos. A este tipo de transformación lo llamamos filtros de Savitzky-Golay. Supongamos que tenemos un conjunto de valores (x_i, y_i) , donde x_i son valores equiespaciados. La solución que buscamos será el conjunto (x_i, g_i) , donde g_i es una combinación lineal de los valores y_i originales:

$$g_i = \sum_{i=-N_L}^{N_R} c_i y_i \quad [\text{A7.2}]$$

En el intervalo con el que construimos la combinación lineal para el valor i -ésimo, tomamos N_L valores a su izquierda y N_R valores a su derecha, de forma que el intervalo estará formado por $N_L + N_R + 1$ puntos. En esta combinación lineal, los coeficientes c_i serán aquellos que resulten de ajustar por mínimos cuadrados los datos de cada intervalo móvil a un polinomio de grado M que mantenga momentos superiores a la media (apuntamiento y curtosis). Si ajustamos $g_0 \approx a_0 + a_1 z + \dots + a_M z^M$, entonces la solución en forma matricial viene dada por:

$$c_i = \{(\mathcal{J}^T \cdot \mathcal{J})^{-1} \cdot (\mathcal{J}^T \cdot \mathcal{U}_i)\}_0 = \sum_{m=0}^M \{(\mathcal{J}^T \cdot \mathcal{J})^{-1}\}_{0m} i^m \quad [\text{A7.3}]$$

La solución de esta ecuación permite obtener una serie de coeficientes que cambiará según sea el intervalo que definamos y el grado del polinomio a ajustar. También a partir de esta convolución podemos obtener las derivadas filtradas. La única condición que debemos garantizar es que el orden del polinomio sea $M \geq 4$. Las restricciones impuestas a los momentos superiores y la consideración de intervalos simétricos ($N = N_L = N_R$) harán que los coeficientes sean también simétricos $c_{-N} = c_N$. Volviendo a las ecuaciones matriciales, podríamos comprobar que $\sum c_i = 1$. En la literatura ^[94] es habitual encontrar estos coeficientes dados como números enteros divididos por un factor de normalización (h). En la tabla siguiente se muestran algunos ejemplos.

$2N+1$	h	C_0	C_1	C_2	C_3	C_4	C_5	C_6	C_7
5	35	17	12	-3	---	---	---	---	---
7	21	7	6	3	-2	---	---	---	---
9	231	59	54	39	14	-21	---	---	---
11	429	89	84	69	44	9	-36	---	---
13	143	25	24	21	16	9	0	-11	---
15	1105	167	162	147	122	87	42	-13	-78

En este ajuste, todos los valores del intervalo tienen la misma contribución al cálculo de los coeficientes del filtro Savitzky-Golay. En general, con un intervalo mayor puedo realizar un ajuste mejor pero dado que las medidas son independientes (no dependen de los valores anteriores, sino sólo de las propiedades de la muestra), puedo ponderar de manera distinta las contribuciones de los valores más alejados del centro del intervalo. Esta modificación la puedo realizar modificando la variable del polinomio mediante una ventana de Parzen, también llamada función de densidad de núcleo (kernel):

$$P_W = 1 - \frac{|i|}{2N+1}; \quad i = \{-N, \dots, 0, \dots, N\} \quad [A7.4]$$

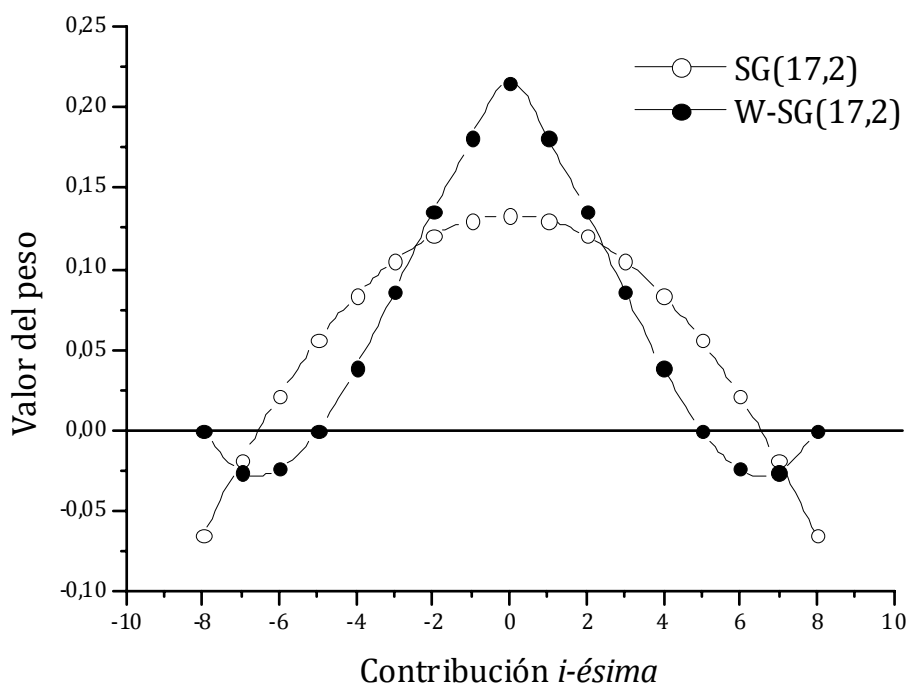


Figura A7.2. Valores de los coeficientes de ponderación de filtros cuadráticos de 17 puntos. (○) Filtro convencional de Savitzky-Golay; (●) filtro de Savitzky-Golay modificado con una ventana de Parzen.

Comparando los filtros modificados con los originales vemos que la ponderación de cada punto del intervalo favorece a los datos más próximos al punto cuyo valor queremos corregir. Además, los filtros modificados siempre anulan la contribución de los extremos, lo que aumenta la velocidad computacional.

Para calcular los coeficientes de este filtro modificado se puede recurrir a la expresión general:

$$W_i = \frac{6[(2n^2 - 3) - 5i^2](n - |i|)}{n^2(7n^2 - 13)} \quad [A7.5]$$

Donde n es tanto el número de puntos a la izquierda como a la derecha ($N=2n+1$). Además, se cumple que i toma todos los valores enteros tal que: $|i| \leq n$. La tabla siguiente recoge los valores de los coeficientes de ponderación para los filtros modificados

$2N+1$	h	C_0	C_1	C_2	C_3	C_4	C_5	C_6	C_7	C_8
7	15	9	4	-1	0	---	---	---	---	---
9	132	58	36	9	-8	0	---	---	---	---
11	675	235	168	81	4	-33	0	---	---	---
13	717	207	160	98	36	-11	-28	0	---	---
15	539	133	108	75	40	9	-12	-17	0	---
17	464	100	84	63	40	18	0	-11	-12	0

Un último aspecto de los filtros tipo Savitzky-Golay (y de hecho es una de sus cualidades más importantes) es conocer su respuesta en frecuencia. Por definición, estos filtros son de tipo paso-bajo (*low-pass filter*), es decir, mantienen una señal de baja frecuencia eliminando el ruido de alta frecuencia.

En la gráfica adjunta se puede observar la respuesta en frecuencia de cinco filtros de segundo orden distintos. SG(9) y SG(17) son filtros de segundo orden para 9 y 17 puntos, alternativamente. Los filtros W-SG(9), W-SG(13) y W-SG(17) son filtros de segundo orden modificados con una ventana de Parzen, para 9, 13 y 17 puntos, respectivamente.

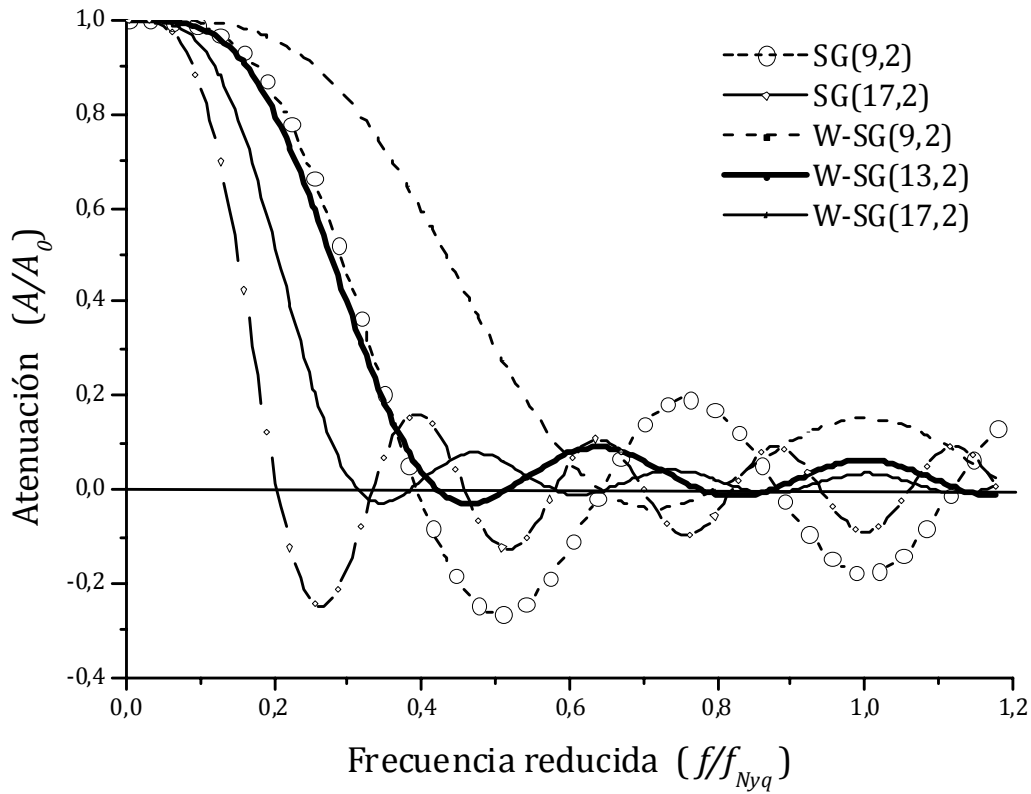


Figura A7.3. Valor de la atenuación de la amplitud de una señal en función de la frecuencia de la señal (expresada de forma adimensional como razón con la frecuencia de Nyquist).

Como se puede observar, la figura A.7.3 representa la atenuación que se produce en la señal al aplicar el filtro en función de la frecuencia de la señal filtrada. f_{Nyq} es la frecuencia de Nyquist (la mitad de la frecuencia de muestreo). Para la zona de bajas y medias frecuencias, observamos que cuanto mayor es el número de puntos de interpolación, mayor es la atenuación de la señal. También es cierto que cuanto mayor es el número de puntos de interpolación, menor es el área de los lóbulos, lo que significa que la amortiguación de altas frecuencias es más eficiente (elimina mejor el ruido aleatorio, por ejemplo).

Comparando los dos tipos de filtros para un mismo número de puntos de interpolación, los filtros modificados con una ventana de Parzen resultan más eficientes a la hora de eliminar las altas frecuencias (el ruido aleatorios y pequeñas perturbaciones) y atenúan mucho menos la señal (no modifican tanto la amplitud de los picos), lo que aumenta su interés en el acondicionamiento de señales espectroscópicas, donde debemos evitar que la amplitud quede amortiguada.